

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



César Bueno de Souza

**“Biotecnologia de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)
para tolerância a estresse hídrico”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
César Bueno de Souza
[Signature]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

Coorientadora: Dra. Andrea Akemi Hoshino

Campinas –SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

So89b Souza, César Bueno de, 1982-
Biotecnologia de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)
para tolerância a estresse hídrico / César Bueno de
Souza. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Marcelo Menossi Teixeira.
Coorientador: Andrea Akemi Hoshino.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cana-de-açúcar. 2. Plantas – Tolerância à seca.
3. Transgênicos. 4. Plantas – Efeito do stress. 5.
Biotecnologia. I. Teixeira, Marcelo Menossi, 1968-. II.
Hoshino, Andrea Akemi. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Biotechnology of sugarcane (*Saccharum* spp.) for drought stress tolerance

Palavras-chave em Inglês:

Sugarcane

Plants – Drought tolerance

Transgenics

Plants – Effect of stress on

Biotechnology

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Menossi Teixeira [Orientador]

Márcio José Silva

Monalisa Sampaio

Eduardo Romano de Campos Pinto

Amanda Pereira de Souza

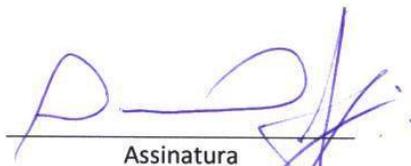
Data da defesa: 23-02-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 23 de março de 2012

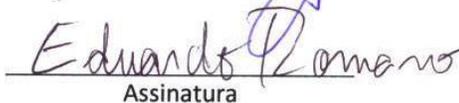
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira (Orientador)



Assinatura

Dr. Eduardo Romano de Campos Pinto



Assinatura

Dr. Manuel Sainz

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Carnier Dornelas

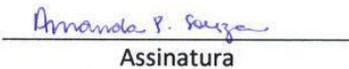
Assinatura

Profa. Dra. Monalisa Sampaio



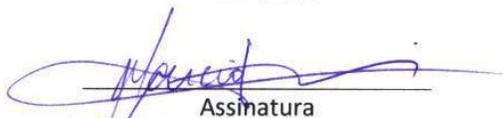
Assinatura

Dra. Amanda Pereira de Souza



Assinatura

Dr. Márcio José Silva



Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

Assinatura

Aos meus pais, com
toda minha gratidão,
dedico.

Agradecimentos

À Deus, autor da vida, pelas oportunidades a mim concedidas.

Aos meus pais, Giselda e Fernando, por todo o apoio durante a minha formação e pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos Gustavo e Fábio pelo companheirismo e amizade eterna. Agradeço também à Cassia por ser mais do que uma cunhada, minha irmã de alma, obrigado pela torcida.

Aos meus tios Augusto e Angela pelo apoio e confiança contínuos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Menossi pela orientação e confiança em mim depositados.

Ao Prof. Dr. David Garvin por me orientar durante o tempo que estive em seu laboratório na Universidade de Minnesota.

À minha coorientadora, Andrea Akemi Hoshino, por ser presente em todos os momentos desse trabalho. Pela orientação, ajuda e ensinamentos além da amizade eterna que também é fruto desse trabalho.

Aos grandes amigos Giane Carolina Bueno, Ilse Fernanda Ferrari e Éder Bedani por todo o apoio e ensinamentos especialmente nos experimentos de transformação genética. Esse trabalho também é de vocês!

Aos companheiros de bancada e amigos do Laboratório de Genoma Funcional pelas ajudas prestadas.

Aos membros da banca examinadora: Dra. Amanda Pereira de Souza, Dr. Eduardo Romano Campos Pinto, Dr. Márcio José Silva e Dra. Monalisa Sampaio Carneiro, pela disposição em participar, pelas sugestões e críticas.

Aos amigos Almir Zanca e Juliana Roncoletta pela força e apoio na decisão de voltar à academia e também durante o desenvolvimento do meu projeto.

À todos os outros nome que tiveram contribuições diretas ou indiretas para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de estudos concedida.

“O estudo em geral, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é consentido ficar crianças toda a vida.”

Albert Einstein

Índice

Resumo	1
Introdução Geral	5
A cana de açúcar no Brasil	5
A tolerância ao déficit hídrico	6
A cana e sua relação ao déficit hídrico	8
Os microarranjos de DNA na seleção de genes candidatos para biotecnologia	10
O uso de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> na produção de plantas transgênicas	12
O uso da biolística na produção de plantas transgênicas de cana.....	14
Plantas modelo para estudos de genes associados à seca	15
Objetivos	18
Apresentação do Trabalho	19
Capítulo 1	20
Capítulo 2	59
Capítulo 3	103
Capítulo 4	125
Discussão Geral	138
Conclusões Gerais	141
Referências Bibliográficas	142

Resumo

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e no cenário atual, em que o aumento na busca por energia renovável é visível, o aumento na produtividade da cana é de extremo interesse para o setor sucroalcooleiro. Estresses abióticos influenciam grandemente a produtividade de espécies como a cana e, sendo assim, estudos relacionados com a tentativa de diminuir esse impacto na produtividade são de grande importância. A seca é o estresse ambiental que mais causa prejuízos ao agronegócio e por esse motivo é muito desejável que se desenvolvam novas variedades de cana-de-açúcar que sejam mais tolerantes a esses estresses e com isso o setor sucroalcooleiro será largamente beneficiado. A transgenia é uma das ferramentas utilizadas na produção de novos cultivares comerciais com características agronômicas interessantes e, para o seu sucesso, a identificação de genes com potencial para melhorar essas características faz-se necessária. Sendo assim, o maior objetivo desse trabalho foi a avaliação do potencial biotecnológico de seis genes de cana-de-açúcar que são modulados por seca. Os genes aqui estudados tiveram seu perfil de resposta a seca anteriormente avaliado por microarranjos de DNA e foram selecionados como candidatos para a produção de um novo cultivar de cana-de-açúcar que seja mais tolerante a estresses abióticos. Esses genes foram analisados em plantas transgênicas de tabaco, cana-de-açúcar e/ou *Brachypodium*. A superexpressão de dois genes de cana em tabaco conferiu maior tolerância a seca e salinidade das plantas transgênicas quando comparadas às selvagens e a proteção de seus usos na produção de plantas tolerantes a estresses abióticos foi solicitada. Há evidências

de que um terceiro gene de cana conferira tolerância ao estresse oxidativo em plantas transgênicas de cana. Além disso, outros três genes de cana foram inseridos em *Brachypodium*, mas os eventos gerados ainda não foram avaliados.

Com o trabalho desenvolvido foi, portanto, possível gerar plantas transgênicas tolerantes a estresses abióticos e com isso é possível concluir que a seleção de genes candidatos para melhorias de características agronômicas de interesse através de microarranjos é algo que deve ser explorado e pode-se concluir, ainda, que alguns dos genes analisados estão envolvidos na resposta a seca e/ou aos estresses ambientais em geral.

Abstract

Brasil is the largest producer of sugarcane in the world and the seeking for renewable energy is currently visible what makes the increase of sugarcane productivity highly desirable. Abiotic stresses greatly influence the productivity of species such sugarcane. Therefore, studies related to the reduction of these impacts on productivity are highly important. Drought is the environmental stress that causes more damage to agribusiness and because of it the development of new cultivars with higher tolerance to abiotic stresses is desirable since the sugar and ethanol sector will be largely benefited. Transgenic plants production is one of the tools that have been used in the development of new cultivars with interesting agronomic traits and for its success identifying genes that can improve these characteristics is necessary. Thus, the main objective of this study was evaluating the biotechnological potential of six drought-modulated genes from sugarcane. The genes studied here have their drought response profile previously showed by microarray and were selected as candidates for the production of a new sugarcane cultivar with higher tolerance to abiotic stresses. These genes were analyzed in transgenic tobacco, sugarcane and/or *Brachypodium* plants. The overexpression of two sugarcane genes in tobacco conferred higher drought and salinity tolerance in tobacco plants compared to wild-type and the protection of their uses in the production of plants with higher tolerance to abiotic stress was requested. There are evidences that a third sugarcane gene confers tolerance to oxidative stress in transgenic sugarcane.

Furthermore, three other genes were inserted in *Brachypodium* but these transgenic events were not yet analyzed.

With this work was possible to produce transgenic plants that are tolerant to abiotic stresses what let us to conclude that the selection of candidate genes to improve agronomic traits by microarrays is useful and that some of the analyzed genes are involved into drought and/or abiotic stresses in general responses.

Introdução Geral

A cana-de-açúcar no Brasil

Pertencente à família Poaceae, a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma gramínea originária do Sudeste Asiático, da região central da Nova-Guiné e Indonésia (Daniels and Roach, 1987). As variedades atualmente cultivadas são resultado de hibridização entre as espécies *S. officinarum* L. ($2n = 80$ cromossomos), a qual contribui com o alto conteúdo de sacarose, e *S. spontaneum* L. ($2n = 40$ a 128 cromossomos), que é responsável pelo vigor vegetativo e tolerância a estresses bióticos e abióticos (Ming et al., 2001). O híbrido resultado desse cruzamento foi utilizado em sucessivos cruzamentos com o parental *S. officinarum* L. até a obtenção dos cultivares modernos e comerciais.

O Brasil é o principal produtor mundial de cana e a agroindústria canavieira é de grande relevância para a economia brasileira. A área cultivada com cana ocupa cerca de 8,36 milhões de hectares de vários estados, sendo 52,2% deste total somente no estado de São Paulo, o maior estado produtor. Minas Gerais possui 8,87% da área cultivada com cana no Brasil, Goiás 8,1%, Paraná 7,3%, Mato Grosso do Sul 5,7%, Alagoas 5,45%, Pernambuco 3,89% e nos demais estados as áreas são menores, porém, com alta produtividade.

A safra nacional de cana 2011/2012 está estimada em aproximadamente 571 milhões de toneladas, o que representaria uma queda de 8,4% em relação à safra passada e implicaria em uma diminuição de 52 milhões de toneladas no total de cana moída (Conab, 2011). Do total de cana produzida, 97,6% (557,29 milhões de toneladas) destina-

se à indústria sucroalcooleira e o restante, 2,4% (13,70 milhões de toneladas), à fabricação de cachaça, alimentação animal, sementes, fabricação de rapadura, açúcar mascavo e outros fins. Das 557,29 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, que estão sendo esmagadas pela indústria sucroalcooleira, 47,3% (283,9 milhões de toneladas) são para fabricação de açúcar e 50,3% (287,6 milhões de toneladas) são para fabricação de álcool (Conab, 2011). Assim, espera-se produzir cerca de 37 milhões de toneladas de açúcar e 23 bilhões de litros de etanol.

A produção de álcool merece especial atenção devido a um aumento cada vez maior em sua exportação para nações com interesse em reduzir a emissão de poluentes na atmosfera e a dependência de combustíveis fósseis. A expansão da área cultivada de cana, o aumento na produtividade bem como novas tecnologias relacionadas à conversão de biomassa (etanol de segunda geração) são as principais alternativas para atingir os níveis de produção necessários neste novo cenário mundial no qual o álcool será uma commodity.

A tolerância ao déficit hídrico

Os cultivos, dentre os quais está o da cana-de-açúcar, estão constantemente expostos a diferentes estresses ambientais, tais como: elevada temperatura, frio, salinidade, metais pesados e seca. As mudanças climáticas e a perspectiva de um aumento nos estresses ambientais desestabilizam a produtividade tanto quanto aumentam o desafio de aumentá-la. A relação entre os estresses ambientais e a produtividade é especialmente importante para culturas com grande importância econômica (Habash et

al., 2009). Estima-se que tais condições de estresse podem, potencialmente, reduzir a produtividade de uma cultura em até 70% (Boyer, 1982; Maybank et al., 1995). Entre os efeitos dos estresses abióticos sobre as plantas estão a redução nas taxas de assimilação de CO₂, no tamanho das células foliares, na taxa de transpiração, no potencial de água na planta, na taxa de crescimento e na abertura estomática (Schulze et al., 1980; Biddington, 1986; Taiz and Zeiger, 2004).

A água é um recurso cada vez mais escasso dado as necessidades atuais e futuras da sociedade humana, o que faz com que uma grande ênfase ao seu uso sustentável seja atribuída (Rosegrant and Cai, 2003). O estresse por seca é considerado, isoladamente, o maior estresse abiótico com impacto na produção agrícola (Ergen and Budak, 2009). Dessa maneira, o entendimento do estresse hídrico e do uso da água no crescimento das culturas vegetais é muito importante para uma agricultura sustentável.

Em linhas gerais, a tolerância à seca está envolvida com a habilidade de uma planta viver, crescer e se reproduzir satisfatoriamente em condições limitantes de água disponível. Passioura (1996) diz que, para a agricultura, tolerância a seca deve ser definida em termos de produtividade em relação à escassez de água. Estratégias de tolerância podem ser divididas em mecanismos de resistência, que permitem que as plantas sobrevivam à desidratação, e mecanismos de proteção, onde as plantas desenvolvem hábitos que previnem sua exposição à desidratação, como maior profundidade das raízes ou diminuição da parte aérea. A capacidade da planta para tolerar a seca depende muito de adaptações presentes em seu genoma e como ativar essas adaptações eficientemente (Kantar et al., 2011). As culturas modernas e domesticadas possuem uma redução drástica

na variabilidade genética de cultivares elite e é possível que tenham acumulado mutações deletérias em seus mecanismos de resposta aos estresses (Tang et al., 2010).

A resposta ao déficit hídrico em plantas tem início a partir de uma complexa via de respostas, logo após a percepção do estresse, o qual desencadeia uma cascata de eventos moleculares, sendo finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento. Uma mudança no potencial osmótico, através da membrana plasmática, pode ser a maior causa de respostas ao estresse hídrico em nível molecular (Bray, 1993). Alterações na conformação da membrana celular provocam mudanças em canais de transporte ativados por pressão, modificam a conformação ou a justaposição de proteínas sensoriais embudadas nas membranas celulares e alteram a continuidade entre a parede e a membrana celular (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1999, 2000). A percepção do déficit hídrico celular precisa ser traduzida em compostos bioquímicos e metabólitos, gerando uma resposta fisiológica ao estresse (Ingram and Bartels, 1996). A busca do entendimento das diferentes respostas das plantas aos estresses ambientais tem levado aos estudos integrados de ecofisiologia, bioquímica, genética e áreas correlatas, visando entender os efeitos da deficiência hídrica sobre o processo fotossintético e reações enzimáticas.

A cana e sua relação com o déficit hídrico

Em cana-de-açúcar, o estresse por seca influencia de maneira direta o crescimento dos perfilhos, a altura final dos colmos e, conseqüentemente, a produção de açúcar (Sugiharto, 2004). Plantas de cana-de-açúcar necessitam de umidade disponível no

solo durante todo o período de crescimento. Porém, durante a maturação, o ideal é que haja redução na disponibilidade de água, não drasticamente, mas o suficiente para reduzir o crescimento e induzir a maior concentração de açúcar nos colmos (Bull, 2000).

Os efeitos gerais do déficit hídrico no crescimento das plantas são razoavelmente bem conhecidos, porém, o mesmo não pode ser dito para os efeitos primários da seca em níveis bioquímicos e moleculares (Zhu, 2002; Chaves et al., 2003; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005).

A identificação de características morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares, observadas durante o processo de adaptação das plantas aos estresses, tem auxiliado na produção de plantas mais tolerantes, seja através do melhoramento genético convencional ou da engenharia genética (Tester and Bacic, 2005; Cherian et al., 2006; Bhatnagar-Mathur et al., 2008). Para tolerância ao estresse hídrico, isto tem acontecido com relativo sucesso, porém com a grande maioria dos eventos, ainda restritos ao campo experimental (Gao et al., 2009; Wu et al., 2009; Ahn et al., 2011).

Neste contexto, membros da RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento Sucroalcooleiro), vêm desde 2004 conduzindo experimentos sob condições de campo e de casa-de-vegetação para estudar os mecanismos de tolerância à seca em cana-de-açúcar. Já foram realizadas as análises agronômicas, fisiológicas e bioquímicas da cultura, além da quantificação instrumental de taxas fotossintética e trocas gasosas instantâneas, potencial hídrico foliar, teores e fluorescência das clorofilas e da discriminação dos isótopos estáveis de carbono. Até o presente momento, os resultados obtidos mostram que as variedades de cana-de-açúcar possuem mecanismos

distintos de tolerância à seca, com destaque para o controle estomático e enrolamento foliar e o tamanho e distribuição do sistema radicular, de maneira que cada variedade responde de forma diferenciada ao estresse hídrico, fatos estes que estão de acordo com os verificados por outros pesquisadores que também trabalharam com cana-de-açúcar (Inman-Bamber and Smith, 2005).

Já com relação aos estudos moleculares em cana-de-açúcar, diversos grupos do Estado de São Paulo formaram o projeto SUCEST-FUN (<http://sucest-fun.org>), cuja finalidade foi associar funções aos genes seqüenciados pelo projeto genoma da cana – SUCEST. Dentre os 238 mil cDNAs, que compõem o banco de dados SUCEST-FUN, foram identificados genes envolvidos em sinalização, resistência à pragas, resposta a estresses bióticos e abióticos, metabolismo de carboidratos e armazenamento de açúcares, desenvolvimento floral, absorção de nutrientes, regulação do ciclo celular, assimilação de nitrogênio e tolerância a alumínio e metais (Vettore et al., 2003). Esses ESTs são um excelente recurso para a descoberta de novos genes para o melhoramento da cana. A partir do SUCEST também foi desenvolvido o banco SUCAST, base de informações sobre genes envolvidos em transdução de sinal na cana-de-açúcar (Souza et al., 2001; Papini-Terzi et al., 2005).

Os microarranjos de DNA na seleção de genes candidatos para biotecnologia

As análises do transcriptoma utilizando a técnica de microarranjos de DNA é uma importante ferramenta nos estudos de resposta a estresses, pois permitem a descoberta

de genes que são ativados ou reprimidos durante a resposta da planta. Estudos de resposta a estresses pela técnica de microarranjos permitiram a identificação de genes que codificam proteínas funcionais, regulatórias e com funções ainda desconhecidas em *Arabidopsis*, arroz, cana-de-açúcar e outras culturas (Ludwikow et al., 2004; Rocha et al., 2007; Goodwin and Sutter, 2009; Kumari et al., 2009).

A partir dos dados do SUCEST e SUCEST-FUN foi iniciado o projeto “Transcriptoma da Cana-de-açúcar”, que produziu microarranjos em lâminas de vidro contendo 6139 elementos. Nesse projeto foram realizados os primeiros experimentos de análise de expressão gênica em larga escala de plantas de cana, com experimentos de interação com bactérias endofíticas, teor de sacarose, ABA, metil jasmonato, seca, ataque de insetos e resposta a alto CO₂ (Papini-Terzi et al., 2005; Rocha et al., 2007; De Souza et al., 2008). Nesse projeto também foi avaliada a resposta a estresses bióticos e abióticos: seca, deficiência em fósforo e herbivoria (Rocha et al., 2007). No caso da resposta à seca, foram obtidos dados em casa de vegetação para uma variedade de cana-de-açúcar susceptível à seca, SP90-1638 (CTC, 2002), submetida à suspensão de rega por 24, 72 e 120 horas. Este tratamento foi o que causou maiores alterações no transcriptoma da cana, 93 genes diferencialmente expressos, entre todos os tratamentos avaliados (Rocha et al., 2007).

A transgenia é uma alternativa para complementar os programas de melhoramento e tem como grande vantagem sobre o melhoramento clássico a possibilidade de transferência apenas dos genes desejados de uma espécie para outra. Potencialmente, isso permite, por exemplo, que apenas os genes ligados a tolerância a

seca sejam transferidos de uma planta tolerante para uma sensível sem que isso comprometa a produtividade.

A partir da identificação de genes modulados por estresses, muitos trabalhos mostraram que esses genes possuem um grande potencial biotecnológico em plantas modelo ou de interesse agrônomo (Agarwal et al., 2008; Agarwal et al., 2010; Gao et al., 2011). Em geral, as plantas transgênicas produzidas nesses trabalhos, superexpressando genes modulados por estresses abióticos, apresentam maior tolerância a estresses, o que suporta a idéia de que a seleção de genes candidatos através de microarranjos de DNA possui um alto potencial biotecnológico. Dessa maneira, a biotecnologia possui um papel imprescindível na atual Revolução Verde que deve desenvolver variedades de plantas com alta produtividade mesmo sob condições de estresses ambientais como a seca (Kantar et al., 2011).

O uso de *Agrobacterium tumefaciens* na produção de plantas transgênicas

A infecção de uma planta por *Agrobacterium* inicia-se pela fixação da bactéria no tecido vegetal. Uma lesão no tecido libera moléculas sinais que atraem as bactérias e que, por sua vez, produzem microfibrilas de celulose que propiciam a sua fixação às células vegetais. As mesmas moléculas sinalizadoras que atraem as bactérias também ativam seus genes de virulência (região vir) localizados no plasmídeo Ti, que é presente em todas as linhagens patogênicas de *Agrobacterium*. A região vir é um regulon composto de seis a oito *operons*, contendo aproximadamente 25 genes. As diversas proteínas codificadas pelos genes *vir* promovem a transferência de uma região do plasmídeo Ti da bactéria para

o genoma da planta. A região transferida é denominada de T-DNA (“transferred DNA”) e é delimitada por duas sequências repetidas de 25 pares de bases conhecidas como bordas de transferência direita e esquerda (Stachel et al., 1985; Horsch and Klee, 1986). O sistema de infecção de plantas pelas agrobactérias representa uma estratégia eficiente na transferência de material genético para plantas alvo, sendo amplamente utilizado na produção de plantas transgênicas que possam agregar valor comercial por possuírem características agronômicas desejáveis.

Plantas monocotiledôneas não são consideradas hospedeiros naturais de agrobactéria, entretanto têm sido descritos eficientes protocolos de transformação genética por agroinfecção em plantas de arroz (Ozawa and Takaiwa, 2010; Ignacimuthu and Raveendar, 2011; Karthikeyan et al., 2011), milho (Vega et al., 2008; Kim et al., 2009) e cana (Arencibia et al., 1998; Manickavasagam et al., 2004; Zhangsun et al., 2007; Khanna et al., 2008).

Wei et al. (2003) mostraram que a expressão de GUS em arroz transformado por *A. tumefaciens* era alta tanto em calos quanto na planta regenerada. Entretanto, os mesmos autores verificaram que a expressão de GUS em cana transformada por bombardeamento era alta em calos e decaía muito nas plantas jovens e adultas mantidas na casa de vegetação e depois no campo, sendo que esta queda de expressão era resultado de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS). A sugestão é de que eventos provenientes de agrotransformação não apresentam diminuição da expressão do transgene.

O uso preferencial da agrotransformação em cana em comparação ao mecanismo de bombardeamento é devido à maior estabilidade do transgene no genoma da planta, bem como a possibilidade de inserção de poucas cópias (Hiei et al., 1994). A inserção de poucas cópias gênicas diminui grandemente a possibilidade de que regiões de alta atividade transcricional sejam interrompidas pelo transgene o que facilitaria na produção de novas variedades de cana que possuam valor agrônômico promissor.

Os principais requisitos para o sucesso na obtenção de plantas transgênicas são o estabelecimento de uma metodologia eficiente de cultura de tecidos e regeneração da espécie alvo. Nesse contexto, o explante selecionado tem uma relevância primordial, pois deve possuir a capacidade de regeneração das plantas transformadas além de sua susceptibilidade à agrobactéria. Muitos trabalhos de agrotransformação de cana-de-açúcar apontam o uso de material juvenil e a produção “in vitro” de calos embriogênicos para os experimentos de transformação (Arencibia et al., 1998; Nandakumar et al., 2010; Basnayake et al., 2011)

O uso da biolística na produção de plantas transgênicas de cana-de-açúcar

Apesar do uso preferencial da agrobactéria em monocotiledôneas, pelos motivos acima citados, o uso da biolística é mais difundido (Wang et al., 2006; Yao et al., 2006; Petrillo et al., 2008; Zuraida et al., 2010). A biolística utiliza microprojéteis em alta velocidade para introduzir ácidos nucléicos em células e tecidos “in vivo”. Foi demonstrado que essas micropartículas (ouro ou tungstênio) penetram a parede e a membrana celular de maneira não-letal, alojando-se aleatoriamente em compartimentos

celulares. Posteriormente o DNA é dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular e integrado no genoma nuclear do organismo receptor (Sanford et al., 1987; Rech et al., 1991).

O bombardeamento de partículas para produção de plantas transgênicas a partir de um cultivar comercial de cana-de-açúcar tem sido explorado (Franks and Birch, 1991). Bower et al. (1996) publicaram um protocolo para transformação genética de cana com alta eficiência, Arvinth et al. (2010) e Zhu et al. (2011) produziram plantas de cana resistentes a pragas pelo método de biolística. Os trabalhos citados mostram que o uso da biolística na transformação genética de cana tem obtido grande sucesso.

Plantas modelo para estudo de genes associados à seca

As plantas modelo, dentre as quais se destacam *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*, tem sido importantes em muitos aspectos no estudo da biologia dos vegetais, incluindo a patologia, fisiologia e os diferentes estresses, permitindo o entendimento de muitos processos biológicos que podem ser aplicados em espécies alvo.

Para prova de conceito e análise de genes envolvidos na resposta a estresses abióticos é fundamental a obtenção de plantas transformadas com construções quiméricas constituídas de sequências regulatórias e um gene seletivo que permite a diferenciação de plantas transformadas de selvagem (Xiong et al., 1999). Por sua excelente resposta a diversos sistemas de transformação, *Nicotiana tabacum* tem sido usada como planta modelo para muitos dos estudos dos mecanismos de respostas aos estresses (Cameron et al., 2006; Vanderlei, 2006), principalmente o estresse hídrico

(Huang et al., 2010; Ji et al., 2010; Begcy et al., 2011), inclusive envolvendo análises fisiológicas (Kishor et al., 1995; Brasileiro and Carneiro, 1998; Muller et al., 2010).

Nos últimos anos, foram produzidas muitas plantas transgênicas de tabaco superexpressando diversos genes relacionados à resposta a estresses abióticos (Kishor et al., 1995; Brandalise et al., 2003; Chen et al., 2011; Huang et al., 2011; Wang et al., 2011). No mesmo contexto, plantas transgênicas de tabaco, superexpressando um gene de soja ou um de *Arabidopsis*, possuem sua tolerância à seca aumentada (Rodrigues et al., 2006; Begcy et al., 2011). Outros trabalhos com tabaco envolveram a superexpressão de genes que ajudam a manter níveis altos de ácido abscísico (ABA) e pouca perda de água por transpiração (Qin and Zeevaart, 2002), redução na transpiração e maior tolerância à seca (Kang et al., 2002), maior crescimento sob condições de estresses hídricos e de salinidade (Kishor et al., 1995), assim como recobrar rapidamente a fotossíntese depois de suportar estresse hídrico severo (Sheveleva et al., 1997).

Apesar do sucesso da transformação de plantas de tabaco e da obtenção de plantas tolerantes a estresses abióticos, existem outras plantas modelo que podem ser utilizadas em estudos de cana-de-açúcar. Além disso, a utilização de uma monocotiledônea, como *Brachypodium distachyon* (*Brachypodium*) é mais adequado. *Brachypodium* é uma gramínea temperada e tem sido indicada como novo sistema modelo para pesquisas com culturas monocotiledôneas devido às suas características morfológicas, genômicas e requisitos de crescimento simples (Garvin, 2007; Bevan et al., 2010). *Brachypodium* possui todas as principais características encontradas nas atuais plantas modelo: auto-fecundação obrigatória, baixa estatura, ciclo de vida curto e genoma

pequeno. A linhagem Bd-21 teve seu genoma completamente sequenciado (Vogel et al., 2010) e protocolos com alta eficiência de transformação foram estabelecidos e publicados (Vogel et al., 2006; Vain et al., 2008; Alves et al., 2009).

Apesar dos estudos em plantas modelos não garantirem a boa performance dos transgenes na cultura alvo, há uma correlação positiva entre a resposta observada em plantas modelo e cultura alvo em diversos casos. Molinari et al. (2007), por exemplo, mostrou que a superexpressão de delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase, uma enzima chave envolvida na biosíntese de prolina, confere tolerância a estresse oxidativo em plantas transgênicas de cana-de-açúcar, o que já havia sido demonstrado por Kishor et al. (1995) em plantas transgênicas de tabaco. O mesmo resultado foi obtido em plantas de trigo (Vendruscolo et al., 2007). Esses dados demonstram que o uso de plantas modelos é uma estratégia eficaz no estudo de genes envolvidos em respostas a estresses abióticos visando o melhoramento genético de culturas de importância comercial.

Objetivos

Objetivo Geral

O objetivo maior do projeto desenvolvido foi avaliar o potencial biotecnológico de genes de cana-de-açúcar que são modulados por déficit hídrico.

Objetivos Específicos

- I. Seleção e clonagem de genes regulados por seca a partir de dados de microarranjos de DNA;
- II. Avaliar funcionalmente o papel dos genes selecionados nos mecanismos de proteção contra a seca empregando plantas transgênicas de tabaco, cana-de-açúcar e *Brachypodium distachion*;
- III. Elaboração de pedidos de patentes para proteger o uso dos genes para produção de plantas tolerantes a estresses ambientais.
- IV. Disponibilizar ferramentas que permitam iniciar o processo de produção de um novo cultivar de cana tolerante a estresses abióticos e sua proteção.

Apresentação do trabalho

No presente trabalho avaliou-se o potencial biotecnológico de alguns genes de cana-de-açúcar diferencialmente expressos sob condições de seca. Os Capítulos 1 e 2 correspondem aos textos dos pedidos de patentes depositados no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial), nos quais é solicitada a proteção do uso de dois genes de cana-de-açúcar que conferem tolerância à estresses abióticos em tabaco. As patentes foram escritas com base num modelo de pedido de patentes utilizado pelo Laboratório de Genoma Funcional e que foi desenvolvido com o auxílio da INOVA (Agência de Inovação da Unicamp). O Capítulo 3 apresenta resultados obtidos com a superexpressão de um gene desconhecido em plantas transgênicas de cana-de-açúcar, enquanto o Capítulo 4 envolve o uso de *Brachypodium* como modelo para estudos de biotecnologia de monocotiledôneas.



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

César Bueno de Souza, Andréa Akemi Hoshino, Éder Bedani Ruis Chagas, Gláucia M. de Souza e Marcelo Menossi Teixeira

Texto do pedido de patente depositado no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

Data de depósito: 22/12/2011

Número de Protocolo: 018110051091

< Uso exclusivo do INPI >



Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
1.2 Qualificação:
1.3 CNPJ/CPF: 46068425000133
1.4 Endereço Completo: Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Campinas - SP
1.5 CEP: 13083-970 1.6 Telefone: 19 3521-5015 1.7 Fax: 19 3521-5210
1.8 E-mail: patentes@inova.unicamp.br

continua em folha anexa

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: INVENÇÃO

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

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

continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido Nº Data de Depósito:

5. Prioridade: interna unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: MARCELO MENOSSI TEIXEIRA
6.2 Qualificação: BRAS, CASADO, PROF. UNIVERSITÁRIO 6.3 CPF: 654.820.699-15
6.4 Endereço completo: RUA GIUSEPPE MÁXIMO SCOLFARO, 371 , EM CAMPINAS - SP
6.5 CEP: 13083-100 6.6 Telefone: 19 3521-6236 6.7 Fax:
6.8 E-Mail: menossi@unicamp.br

continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome: LUCIANA ALBOCCINO BARBOSA CATALANO

9.2 CNP/CPF: 157.723.748-00

9.3 APROAB: 162.863

9.4 Endereço completo: Procuradoria Geral da UNICAMP, em Campinas - SP

9.5 CEP: 13083-970

9.6 Telefone: 19 3521-4770

9.7 Fax: 19 3289-4245

9.8 E-Mail: proc-geral@pg.unicamp.br

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

Listagem de sequências em arquivo eletrônico n° de CDs ou DVDs (original e cópia).

Código de controle alfanumérico no formato de código de barras. fl.

Listagem de sequências em formato impresso 2 fls.

Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09. fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	25 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2 Procuração	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Revindicações	6 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	2 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) ANEXOS				3 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 41 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Campinas, SP, em 22.12.2011

Local e Data

Assinatura e Carimbo
Luciana Alboccino Barbosa Catalano,
Procuradora de Universidade Subchefe
Matrícula n.º 284996
OAB/SP n.º 162.863

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

CAMPO DA INVENÇÃO

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

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

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

as respostas fisiológicas e moleculares das plantas aos estresses, abrindo perspectivas de aumentar o rendimento em condições de estresses.

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

Nos últimos anos tem-se obtido grande avanço nas tecnologias para a transformação de plantas e as pesquisas têm se voltado para a necessidade de desenvolver eficazes métodos de transformação genética das principais espécies de

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

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

Dentro dos estresses, os de tipo abiótico têm tido um interesse particular para aplicação na agricultura devido ao efeito negativo sobre o desenvolvimento e a produtividade em geral, bem como pelo temor às mudanças climáticas. Um dos tipos de estresses mais estudados e conseqüentemente com alto número de patentes é a seca, que é a principal causa de déficit hídrico ou estresse osmótico nas plantas (**Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, et al. (2008) Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. Field Crops Research 105: 1-14**).

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

Dentre os diversos polinucleotídeos identificados por nosso grupo como diferencialmente expressos sob condições de seca, o que codifica um polipeptídeo com similaridade a polipeptídeos relacionados à subunidade β da ATP sintase foi selecionado e o seu papel na proteção contra estresses abióticos é revelado nesta invenção. As ATP sintases são importantes enzimas que fornecem energia para as células e foram muito

conservadas durante a evolução. As enzimas bacterianas possuem essencialmente a mesma estrutura daquelas encontradas nas mitocôndrias de animais, plantas e fungos e também nos cloroplastos das plantas. Na maioria dos sistemas as ATP sintases são localizadas nas membranas e catalisam a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato
5 direcionado pelo fluxo de prótons entre a membrana e gerados pela transferência de elétrons. O fluxo parte do lado fotoquímico positivo (alto potencial eletroquímico) para o lado fotoquímico negativo. A reação catalizada pela ATP sintase é completamente reversível.

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

Os mecanismos de tolerância à seca em plantas têm semelhanças com outros tipos de estresses **(Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annual Review of Plant Biology 57: 781-803)**, uma vez que as mesmas proteínas e
20 osmoprotetores estão envolvidos em respostas moleculares para diferentes tipos de estresse. Adicionalmente, a maioria dos estresses abióticos começa com um tipo de estresse, por exemplo, osmótico que logo desencadeia os outros. Isto implica que um

gene ou via de transdução de sinais identificados como resposta a um estresse específico pode estar envolvido nas respostas de vários outros tipos de estresses (Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) e Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 247-273).

5 Ao nível celular, as membranas celulares servem como uma barreira permeável para a perda de água e de algumas moléculas importantes. Porém, durante o estresse osmótico, a disponibilidade de água intercelular é restrita, o que altera as concentrações extracelulares de solutos, levando a um desequilíbrio osmótico. Desta forma ocorre um
10 aumento nas concentrações intracelulares de solutos. As espécies reativas de oxigênio e toxinas geradas durante esse processo também podem causar um dano extensivo para a célula.

Muitas são as patentes que descrevem diferentes proteínas capazes de conferir tolerância a fatores abióticos como seca e estresse salino, tais como os elementos de
15 ligação a DNA ativados em resposta a desidratação (DREB/CBF), os quais compõem uma importante família com um papel chave na regulação de transdução de sinal induzida pelo estresse (Oh S, Song S, Kim Y, Jang H, Kim S, Kim M, Kim Y, Nahm B, Kim J. (2005). **Arabidopsis CBF3/DREB1A and abf3 in transgenic Rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiology*. 138:341-351; Stockinger E, Gilmour S,
20 Thomashow M. (1997). Arabidopsis Thaliana CBF1 Encodes An AP2 Domain-Containing Transcription Activator That Binds To The C-Repeat/DRE, A Cis-Acting DNA Regulatory Element That Stimulates Transcription In Response To Low Temperature And Water**

Deficit. Proceedings of the National Academy of Sciences. 94:1035-1040). Proteínas CBF/DREB possuem diferentes domínios e foram identificadas em diferentes espécies. Os documentos **US7368630**, **US7259297** e **US7253000** utilizam estes importantes reguladores da transcrição para a produção de plantas transgênicas tolerantes ao estresse hídrico.

5 A patente **US7368630** descreve um método para usar o gene *DREB1A* para produzir uma linha de células vegetais, tecidos ou plantas com este fator de transcrição, assim como os genes induzidos por desidratação a partir de estudos de microarrays. Por sua vez, o documento **US7259297**, descreve plantas transgênicas criadas pela introdução de um gene que codifica um fator de transcrição DREB que se liga ao elemento de
10 resposta a seca DRE/CRT (Drought Response Element/Crepeat) e ativa a transcrição de genes localizados em promotores com o referido motivo DRE. Segundo essa patente, a superexpressão do fator de transcrição DREB ativa os genes *Rd29A*, *Rd29B*, *Rd17*, *Rd22*, *DREB1A*, *Cor6*, *Cor15a*, *Erd1* e *Kin1*, induzindo uma resposta rápida na planta quando esta submetida ao estresse.

15 Da mesma forma, a patente **US7253000** compreende uma sequência de ácido nucléico que utiliza um dos genes pertencentes ao grupo CBF (C-repeat/dehydration-responsive element binding factor, que é outro nome dado aos fatores DREB).

 Outras patentes descrevem o uso de vários fatores de transcrição envolvidos na tolerância ao estresse em plantas como, por exemplo, a **WO2005024028** e **JP2006158402**,
20 que empregam fatores de transcrição tipo dedo de zinco (*Zinc finger*) para conferir tolerância a estresse hídrico nas plantas. Por sua vez, o documento **US2008163397**, utilizou o fator de transcrição *CAAT-binding*, conferindo tolerância a seca e ao estresse por

frio, utilizando o domínio B do fator de transcrição. Da mesma forma, na patente **US2009265813** utiliza-se o fator de transcrição AP2, para obtenção de plantas transgênicas relacionadas com múltiplas características, incluindo o crescimento reforçado da raiz e obtendo tolerância à seca como resultado final.

5 As patentes aqui mencionadas são reflexo do potencial biotecnológico dos genes que codificam fatores de transcrição, proteínas quinases e outras proteínas envolvidas nas respostas das plantas à seca. Essas proteínas atuam protegendo diretamente componentes celulares durante a desidratação, bem como amplificando o sinal molecular da percepção do estresse hídrico, permitindo a planta antecipar e acelerar os mecanismos
10 de defesa. Nenhum documento apresenta proteção sobre sequências de polinucleotídeos que codifiquem sequências de polipetídeos com alta similaridade à proteínas correspondentes à subunidade β da ATP sintase, como é o caso da presente invenção.

Apesar do crescimento em pesquisas com cana-de-açúcar, são poucos os exemplos de invenções que utilizam genes de cana para produção de plantas com maior
15 tolerância a estresses abióticos (**Affenzeller MJ, Darehshouri A, Andosch A, Lutz C, Lutz-Meindl U (2009) Salt stress-induced cell death in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. J Exp Bot 60: 939-954** e **Molinari HBC, Marur CJ, Daros E, de Campos MKF, de Carvalho JFRP, et al. (2007) Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum spp.*): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence
20 and oxidative stress. *Physiologia Plantarum* 130: 218-229**). Além dos trabalhos acima citados recentemente dois pedidos de patente foram solicitados pelo nosso grupo (documentos **PCT/BR2011/000201** e **PCT/BR2011/000202**) onde reivindica-se a proteção

do uso de dois genes de cana-de-açúcar (*Scdr1* e *Scdr2*) que codificam proteínas de funções desconhecidas que conferem tolerância a seca e sal em plantas transgênicas de tabaco. O uso de genes de cana que dão tolerância a estresses abióticos, em contraponto a genes de outras espécies, permite a produção de plantas transgênicas da cana contendo genes da própria cana, os quais têm maior aceitação pelos consumidores. De fato, 70% dos consumidores dão suporte a modificações genéticas envolvendo genes da própria espécie, em contraste com o suporte de 26% quando se tratam de genes de outras espécies (Rommens CM (2010) **Barriers and paths to market for genetically engineered crops. Plant Biotechnology Journal 8: 101-111**).

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

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

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

Em uma forma mais ampla, o polinucleotídeo de cana-de-açúcar é expresso por um promotor e um terminador que funcionam em plantas. Mais especificamente, a

presente invenção proporciona um polinucleotídeo de DNA recombinante no sentido 5' para 3', que compreende um promotor que funciona em plantas, operacionalmente ligado a um segundo polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de cana, operavelmente ligado ao terminador que finaliza a transcrição do polinucleotídeo de DNA fornecendo um

5 sítio de poliadenilação.

A invenção também descreve uma sequência de DNA recombinante em que o promotor é selecionado do grupo constituído por promotores induzíveis, promotores constitutivos, promotores regulados temporalmente, promotores com preferência por tecidos, promotores de estresses específicos, promotores induzíveis por seca, promotores

10 induzíveis pelo déficit de água, e os promotores tecido-específicos.

Também são descritas células vegetais e plantas que contêm em seu genoma moléculas de DNA recombinante, tal como descrito e os propágulos e descendentes delas produzidas. As plantas incluem, mas não estão limitadas a plantas de cultivo, monocotiledôneas ou dicotiledôneas e dentre elas podem-se incluir cana-de-açúcar, soja,

15 milho, canola, arroz, algodão, cevada, aveia, grama, trigo, pinhão manso, mangueira, goiabeira, limoeiro, abacateiro, laranjeira, ameixeira, pitagueira, jabuticabeira, macieira, pessegueira, batateira, ervilheira, tomateiro, roseira, girassol, feijão, eucalipto, abacate, morango, pêra, maçã, goiaba, cacau, limão, maracujá, palma forrageira, mamona, mandioca, seringueira, mate, jacarandá, café, abóbora, melancia, pêssego, pitanga e caju.

20 A invenção também descreve um método para produção de plantas tolerantes aos estresses abióticos, graças à transformação genética com uma molécula de DNA recombinante que expressa um polipeptídeo de cana, bem como as plantas e suas células

e propágulos, como sementes, contiverem em seu genoma moléculas desse DNA recombinante.

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

A presente invenção compreende a propagação das plantas geneticamente modificadas, com a finalidade de gerar sementes, plantar tais sementes no solo, ou brotação, como é o caso de uso de toletes em cana-de-açúcar, e que permite o crescimento das plantas sob condições de estresse. Mais especificamente, esta invenção fornece um método para produzir uma planta que tem como uma das características, tais como tolerância a estresses abióticos, aumento ou incremento no rendimento da massa de raízes. A invenção compreende as etapas de inserir no genoma de uma célula de planta, a construção de uma molécula de DNA recombinante compreendendo um polinucleotídeo de cana-de-açúcar, a obtenção de uma célula de planta transformada ou

células transformadas, a regeneração de plantas transformadas de células vegetais e a seleção de plantas que apresentam melhores características agronômicas. Uma das características da invenção é o fato das plantas selecionadas apresentarem maior tolerância a estresses abióticos selecionado do grupo consistindo de tolerância ao estresse salino, tolerância à seca e sobrevivência após o a combinação de estresses abióticos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS E ANEXOS

Figura 1: Sequências utilizadas na transformação genética de tabaco. (A) Sequência de polinucleotídeo (SEQ ID NO: 1) e sequência do polipeptídeo deduzido (B) (SEQ ID NO: 2).

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

Figura 3: Vetor binário, pCAMBIA2301::C10, utilizado na agrotransformação de plantas de tabaco. Os cassetes de seleção, repórter e de expressão do polipeptídeo codificado pela SEQ ID:1 foram clonados sob controle do promotor do vírus do mosaico da couve-flor CamV35S e o terminador do gene da Nopalina sintase (NOS) de agrobactéria. Para a

seleção foi utilizado o gene *nptII* que confere resistência ao antibiótico canamicina e como repórter o gene *uidA* que codifica a proteína β -glucuronidase (GUS).

Anexo 1: Fases da transformação genética de tabaco. (A) Produção de explantes que serão utilizados na transformação de tabaco. Sementes de tabaco selvagem germinadas em placas de petri contendo meio Murashige-Skoog (MS) com 0,28% (w/v) de phytagel. As plantas foram crescidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16/8h luz/escuro (300–400 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 25°C e umidade relativa de 75–80%. (B) Discos foliares de tabaco após a infecção com agrobactérias e mantidas em placa contendo meio MS (suplementado com 1 mg/L de benzilaminopurina, 0.1 mg/L de ácido naftalenocético e 0,0059g/L de acetoseringona) por 3 dias. (C) Os discos infectados em meio seletivo (sais MS, 1 mg/L de benzilaminopurina e 100 mg/L de canamicina). (D) Regeneração de plantas tolerantes ao antibiótico canamicina em placas contendo meio MS com 200 mg/L de canamicina. (E) Transferência das plântulas para fracos contendo meio MS para o alongamento e enraizamento.

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

Anexo 3: Análise fenotípica de plantas selvagens (não modificadas geneticamente) e transgênicas que possuem a SEQ ID NO: 1 após estresse hídrico. (A) Porcentagem de plantas sobreviventes após o estresse por seca. Plantas de dois meses de idade foram

privadas de água por 15 dias e reidratadas por 3 dias. O experimento foi realizado com 6 réplicas biológicas e o número de plantas sobreviventes foi contado. (B) Planta sobrevivente na esquerda e planta morta na direita. As plantas foram mantidas em condições normais até o florescimento.

5 **Anexo 4:** Efeitos de diferentes concentrações de NaCl em discos foliares de tabaco transgênico contendo a SEQ ID NO.1 e selvagem. Discos foliares de plantas transformadas com vetor contendo a SEQ ID NO:1 e selvagens foram tratados com 1 mL de meio MS líquido meia força com 0 a 400 mM de NaCl por 5 dias. (A) Discos foliares utilizados como padrão para avaliar os efeitos do estresse salino. Os fenótipos visuais foram escalonados
10 de 1 a 4 de acordo com a intensidade da cor verde e o tamanho. (B) 6 discos de cada planta foram coletados e inoculados em meio MS contendo NaCl e após 5 dias os efeitos do estresse salinos foram avaliados e escalonados de acordo com os padrões mostrados em (A). (C) Conteúdo total de clorofila das linhagens transgênicas e selvagem após estresse salino. O experimento foi realizado com 4 réplicas biológicas.

15

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

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

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

Como tal, as aplicações da invenção incluem, mas não estão limitadas, à melhoria da produção de plantas que sejam tolerantes a esses estresses abióticos. Da mesma forma, a invenção compreende as sequências com identidade igual ou superior a 60% à SEQ ID NO: 1, mas não limitantes a somente elas.

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

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

Biochemical Education 11: 82-82). O plasmídio resultante, que inclui a SEQ ID NO:1 pode então ser usado para transformar uma célula vegetal, plantas ou partes de plantas por métodos convencionais de transformação.

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

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

O plasmídeo, de preferência, também inclui os promotores adequados para a expressão do ácido nucléico indicado na SEQ ID NO: 1 e também para a expressão do gene marcador de seleção, assim como do gene repórter. O promotor do vírus do mosaico da couve-flor 35S (CaMV 35S) é comumente utilizado na transformação de plantas, bem

como o do gene da actina 1 de arroz (Act1), da ubiquitina 1 (Ubi1), o promotor do gene da alfa-amilase, e promotores de genes induzidos por estresse. Na presente invenção, o promotor utilizado é o promotor CaMV 35S, mas outros promotores também podem ser utilizados.

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

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

 Para a produção de plantas transgênicas, qualquer método adequado para a
20 transformação de monocotiledôneas ou dicotiledôneas pode ser usado, como, por exemplo, a transformação mediada por *Agrobacterium* ou bombardeamento de partículas (também conhecida como transformação de biolística ou biolística). Na transformação

mediada por *Agrobacterium*, as células vegetais são colocadas em contato com um inóculo de bactérias transformadas com o plasmídeo contendo o DNA indicado na SEQ ID NO: 1 da invenção. Bactérias do gênero *Agrobacterium* que podem ser utilizados para transformar células vegetais incluem espécies de *Agrobacterium rhizogenes* ou
5 *Agrobacterium tumefaciens*, preferencialmente as cepas *A. tumefaciens* LBA4404, EHA105 ou GV301. *Agrobacterium* spp. são transformadas com o plasmídeo por métodos convencionais conhecidos.

Por sua vez, utilizando-se um protocolo de transformação de discos foliares, bactérias de *A. tumefaciens* com o DNA indicado na SEQ ID NO: 1 clonado em vetor
10 binário são cultivadas em um meio de crescimento na presença de antibióticos, como por exemplo, canamicina, para selecionar as células bacterianas que possuem o plasmídeo binário. Em seguida, folhas de tabaco selvagem são esterilizadas superficialmente, cortadas em pequenos discos e incubadas numa suspensão de *A. tumefaciens* por um tempo adequado. Diferentes tecidos podem ser utilizados para a transformação, tais
15 como folhas, talo, flor dentre outros. Após a incubação com *A. tumefaciens* as folhas infetadas são transferidas ao meio de cultura “in vitro” por determinado período de tempo. A seleção das plantas transgênicas é iniciada colocando-se as plantas infetadas no meio de seleção “in vitro” com antibiótico. Após o desenvolvimento de plântulas com raízes ocorre a transferência para solo e o crescimento em câmara de crescimento.

20 Adicionalmente, a presente invenção refere-se à produção de plantas transgênicas transformadas com plasmídeos contendo a sequência indicada em

SEQ ID NO: 1, aumentando sua tolerância a estresses abióticos, como seca e alta salinidade.

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

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

Plantas transgênicas, de acordo com a invenção, incluem, sem limitação, os cereais, como trigo, cevada, milho, arroz, aveia, gramíneas forrageiras, turfa, outras monocotiledôneas como cana-de-açúcar, miscanthus, ou qualquer espécie de cultura de outros alimentos como o feijão, a soja, ervilha, tomate, colza, bem como outras espécies de interesse econômico, como o tabaco, a laranja, etc.

EXEMPLOS

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

Para avaliar o padrão de expressão do polinucleotídeo SEQ ID NO: 1 sob seca foi feito um Real time-PCR quantitativo conforme descrito por Rocha et al (**Rocha FR, Papini-Terzi FS, Nishiyama MY, Vencio RZN, Vicentini R, et al. (2007) Signal transduction-related**

responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. BMC Genomics 8) utilizando folhas de uma variedade de cana com maior tolerância à seca (RB867515) e de outra com maior sensibilidade à seca (RB855536) mantidas sob irrigação ou em sequeiro (com suspensão de rega, equivalente à estresse por seca). Como gene de referênci

5 referênci

A expressão sob seca (sequeiro) foi determinada a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. Methods 25: 402-408), utilizando amostras não submetidas ao estresse (irrigadas) como controle. A interpretação dos resultados baseou-se na premissa de que o gene seja pelo menos duas vezes mais exp

10 resultados baseou-se na premissa de que o gene seja pelo menos duas vezes mais exp

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

15

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

Um clone com sequência de polinucleotídeos de cana-de-açúcar com similaridade a genes que codificam a subunidade β da proteína ATP sintase foi obtido do “Brazilian Clone Collection Center” (BCCCENTER, Jaboticabal, Brasil). A partir desse DNA a sequência codificante, indicada na SEQ ID NO: 1 (**Figura 1**), foi amplificada por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos 5’- CCATGGTGGCGCTGGACAAG-3’ e 5’-

20 Clone Collection Center” (BCCCENTER, Jaboticabal, Brasil). A partir desse DNA a sequência codificante, indicada na SEQ ID NO: 1 (**Figura 1**), foi amplificada por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos 5’- CCATGGTGGCGCTGGACAAG-3’ e 5’-

GGTCACCTCAGGCGGATGGG -3', e clonada no vetor pGEMT-Easy (Promega, EUA). Posteriormente, um fragmento contendo a SEQ ID NO: 1 foi retirada do vetor pGEMT-Easy com a enzima *EcoR* I e inserido no vetor pRT104 digerido com a mesma enzima. O cassete de expressão foi liberado pela digestão com *Hind* III e clonado no vetor de expressão pCAMBIA2301 (Cambia, Austrália), também digerido com a mesma enzima. A construção recombinante final resultante, pCAMBIA2301::C10 (**Figura 3**) foi introduzida em *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 .

Exemplo 3: PRODUÇÃO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

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

Folhas de tabaco foram cortadas em discos pequenos e incubadas com 15 suspensões de *A. tumefaciens* por 5 a 10 min. Após isto, as folhas infetadas foram transferidas ao meio MS (suplementado com 1 mg/L de benzilaminopurina, 0.1 mg/L de ácido naftalenocético e 0,0059g/L de acetoseringona) por 3 dias. Os discos infectados foram transferidos para meio seletivo (sais MS, 1 mg/L de benzilaminopurina e 100 mg/L de canamicina). As plantas que começaram a se desenvolver foram transferidas para meio 20 MS com 200 mg/L de canamicina (**Anexo 1**). As plantas enraizadas foram transferidas para o substrato Flores e Folhagens (BIOMIX) e mantidas em casa-de-vegetação sob condições normais até o florescimento e coleta de sementes.

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

A caracterização inicial das plantas enraizadas e transferidas para solo foi feita
5 pelo ensaio histoquímico de GUS utilizando-se o substrato X-Gluc para a detecção do gene
que codifica a proteína β -glucuronidase, também inserido no cassete de expressão.

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

10 Em seguida foi extraído DNA total de amostras de folha de plantas selvagens e
plantas transgênicas. Para tal, coletaram-se cerca de 50 – 150 mg de folha, que foram
macerados em microtubos de centrífuga com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó
bastante fino, ao qual acrescentaram-se 500 μ L de tampão de extração (Tris 100 mM
pH=8.0, EDTA 50 mM pH=8.0, NaCl 500 mM, β -mercaptoetanol 10mM) seguidos das da
15 adição de 35 μ L de SDS 20%. As amostras foram, então, mantidas em banho-maria a 65°C,
por 10 minutos e 130 μ L de Acetato de Potássio 5M foram adicionados e, então, os tubos
foram mantidos em gelo por 5 minutos.

Em seguida, os tubos foram centrifugados numa microcentrífuga a 15.000 g
durante 10 minutos. O sobrenadante foi, então, transferido para um novo tubo plástico de
20 1,5 mL contendo 640 μ L de álcool isopropílico e 60 μ L de acetato de sódio 3M, misturado
por inversão e incubado a -20°C por 10 minutos. Em sequência, os tubos foram
centrifugados numa a 15.000 g durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O

DNA precipitado foi lavado nos próprios tubos com álcool 70%, por três vezes e foram adicionados 100 µL de água ultra pura acrescida de RNase A 100 mg/mL e, então, incubada a 37°C por 30 minutos. O DNA genômico foi armazenado a 4°C.

A presença de SEQ ID NO: 1 no DNA genômico extraído de plantas transgênicas de tabaco foi confirmada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação do gene *nptII* (**Anexo 2**). Inicialmente foram utilizados 1.0 µL de DNA, 0,5 µL dNTP (10 mM), 1.0 µL MgCl₂ (25 mM), 0,75 µL de "primer" direto (10 µM), 0,75 µL "primer" reverso (10 µM), 2,5 µL Tampão *Taq* 10x, 0,3 µL *Taq* DNA Polimerase (Fermentas), 18,2 µL de água Milli-Q e essa reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 10 minutos à 95°C, mais 35 ciclos de 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 65°C, 1 minuto à 72°C e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

O produto dessa reação foi visualizado em gel de agarose 0,8% em TAE contendo brometo de etídeo, sob iluminação de luz ultra-violeta. Dentre as 9 amostras de plantas que apresentaram a coloração azul para o ensaio histoquímico de GUS, a presença do gene *nptII* foi confirmada em todas. Essas plantas foram utilizadas nos ensaios posteriores para observar os efeitos da SEQ ID NO: 1 nas características das plantas de tabaco transgênicas.

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

Para verificar a resposta à suspensão de rega das plantas transgênicas em comparação com as plantas selvagens foram utilizadas plantas de tabaco (T2) em que a homozigose do transgene foi verificada. Para isso sementes das linhagens homozigotas

foram germinadas e as plantas foram transferidas para potes com 300 g de substrato Flores e Folhagens (BIOMIX) e mantidas sob condições normais de rega até atingirem 2 meses de idade. Esse procedimento foi realizado com plantas do tipo selvagem e com plantas transgênicas identificadas no Exemplo 4.

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

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

Exemplo 6: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE SALINO EM DISCOS DE PLANTAS

20 TRANSGÊNICAS CONTENDO A SEQ ID NO: 1

Discos foliares de 3 eventos transgênicos independentes que possuem a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens foram tratados com 1mL de meio MS líquido meia

força com 0, 200, 300 e 400 mM de NaCl por 5 dias. Após o período ao qual os discos foram submetidos ao estresse salino, estes foram numerados, dispostos aleatoriamente e quatro pessoas foram solicitadas para atribuir notas de 1 a 4 para os efeitos fenotípicos do estresse baseando-se em 4 padrões previamente estabelecidos (**Anexo 4A**). Nenhum

5 avaliador teve conhecimento prévio de quais discos correspondiam a linhagens transgênicas ou selvagens bem como quais eram as réplicas do experimento. A média entre as notas atribuídas pelos 4 avaliadores para cada uma das amostras foi calculada para inferir a severidade do estresse (**Anexo 4B**). Dados mostram que as linhagens transgênicas são mais tolerantes ao tratamento com 200 mM de NaCl do que as plantas

10 não transformadas e que não existe diferença significativa entre transgênicos e selvagens nos outros tratamentos testados. Após a avaliação do fenótipo visual, o conteúdo de clorofila foi quantificado como descrito por Arnon (1949) (**Arnon, D.I. (1949). Plant Physiology 24: 1-15**) O NaCl causou uma redução no teor de clorofila em todas as plantas. No entanto, os dados confirmam que a retenção da clorofila nos eventos transformados

15 com a SEQ ID NO: 1 é maior do que nas plantas não transformadas no tratamento com 200 mM de NaCl (**Anexo 4C**).

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

REIVINDICAÇÕES

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

- a) Produção de um vetor que compreenda a sequência polinucleotídica de interesse descrita em SEQ ID NO: 1;
- b) Produção de um vetor em que a sequência descrita em SEQ ID NO: 1 esteja operacionalmente ligada a um promotor funcional em plantas;
- c) Produção de um vetor em que a sequência descrita em SEQ ID NO: 1 esteja operacionalmente ligado a um terminador funcional em plantas;
- d) Inserção do dito vetor compreendendo a sequência descrita em SEQ ID NO: 1, o promotor e o terminador no genoma de célula vegetal, planta ou partes de plantas.

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

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

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

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

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

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

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

A

```

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

```

B

```

Met Val Ala Leu Asp Lys Leu Tyr Phe Thr Pro Leu Gly Lys Phe Met
1           5           10
Asp Glu Arg Asp Ala Lys Ile Arg Gly Glu Leu Gly Asp Val Lys Asp
20          25          30
Ala Ser Glu Glu Val Lys Gln Leu Glu Glu Gln Ala Val Ala Ile Met
35          40          45
Lys Ala Ala Arg Ala Glu Ile Ala Ala Ala Leu Asn Lys Met Lys Lys
50          55          60
Glu Thr Thr Ala Glu Leu Glu Ala Lys Leu Glu Glu Gly Arg Ser Arg
65          70          75
Val Glu Ala Glu Leu Val Glu Ala Leu Ala Asn Leu Glu Ala Gln Lys
85          90          95
Glu Glu Ala Val Lys Ala Leu Asp Ala Gln Ile Ala Ser Leu Ser Asp
100         105         110
Glu Ile Val Lys Lys Val Leu Pro Ser Ala
115         120

```

Figura 1

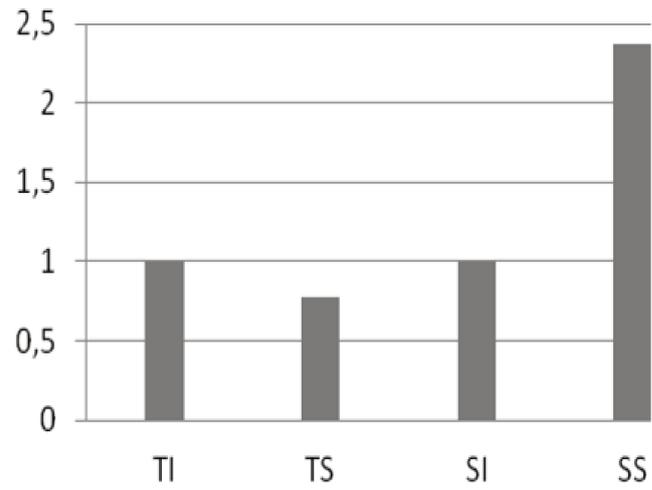
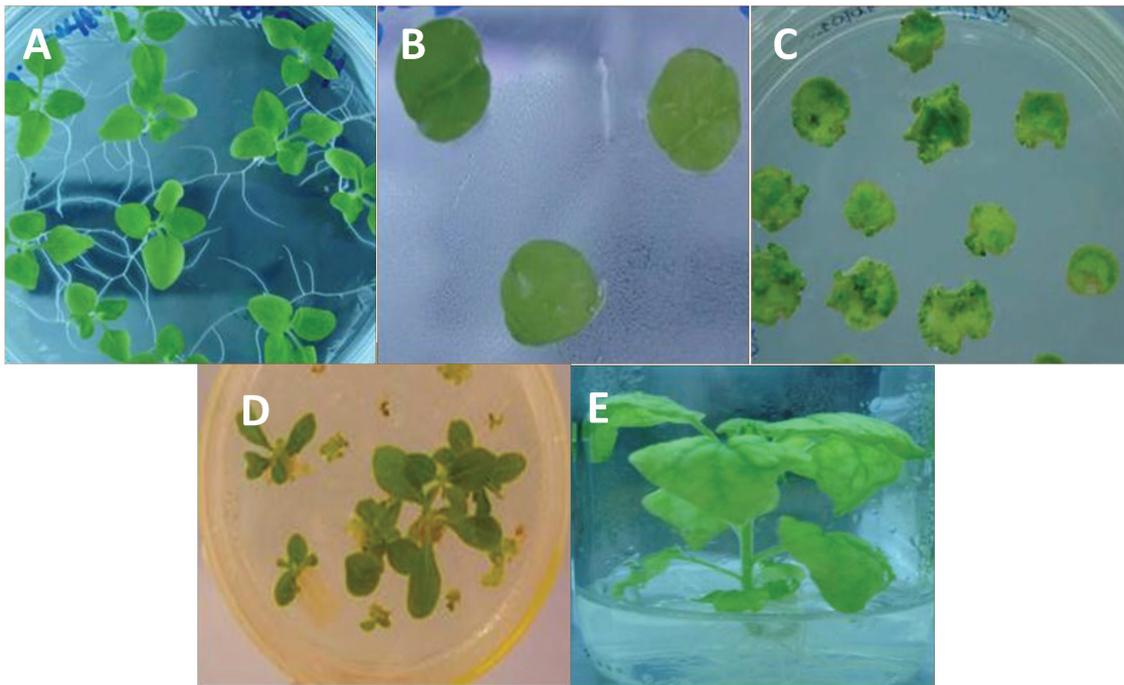


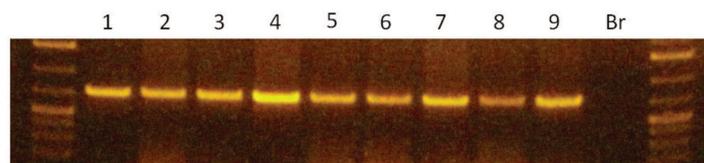
Figura 2



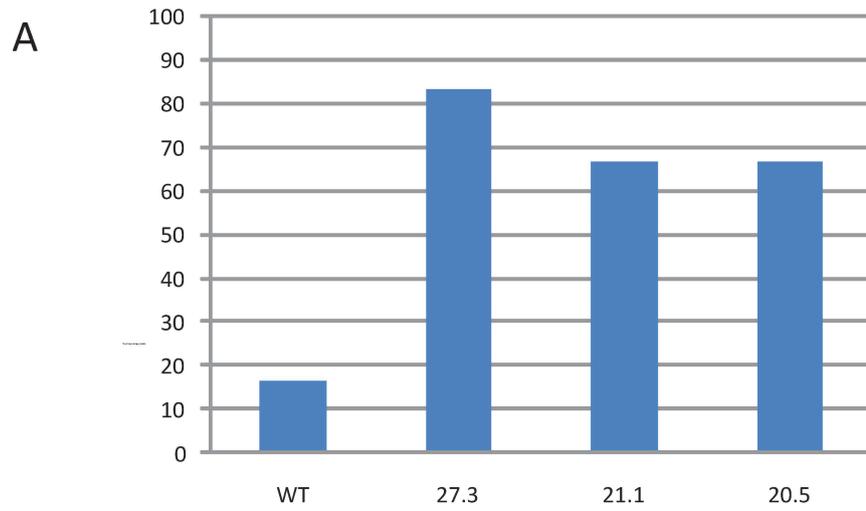
Figura 3



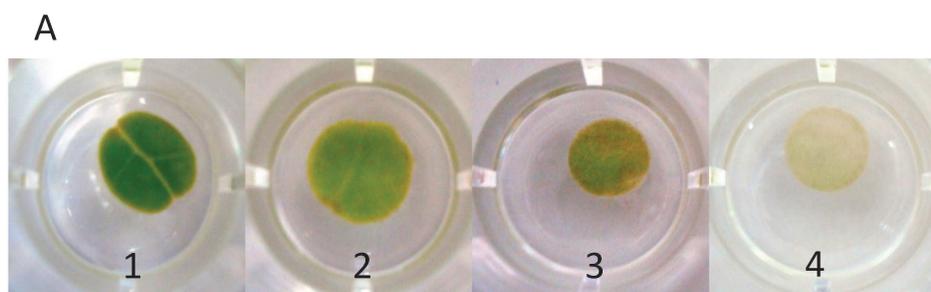
Anexo 1



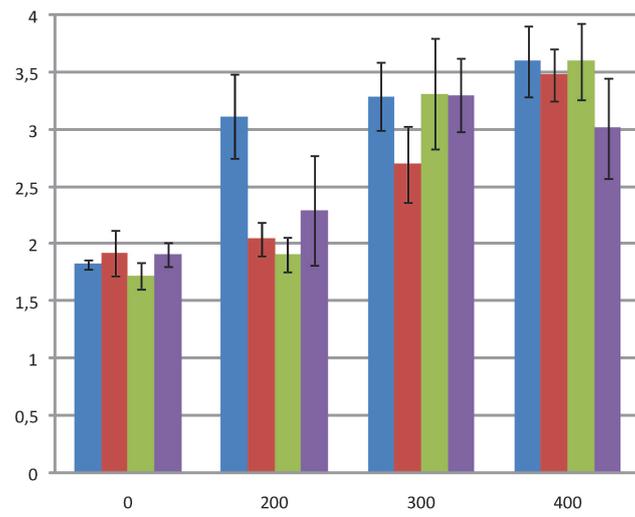
Anexo 2



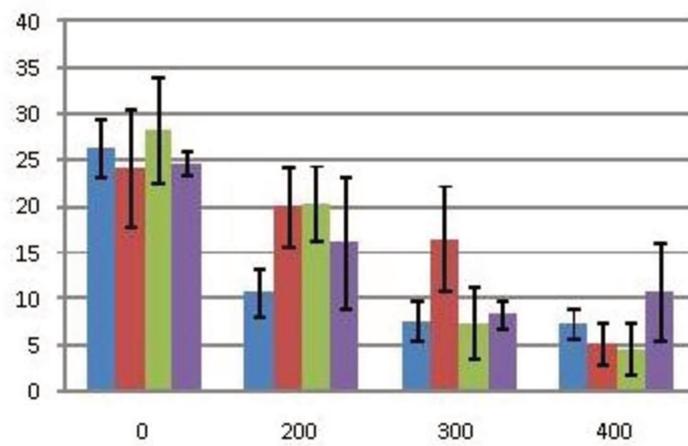
Anexo 3



B



C



Anexo 4

2

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

César Bueno de Souza, Andréa Akemi Hoshino, Éder Bedani Ruis Chagas, Giane Carolina Bueno, Gláucia M. de Souza e Marcelo Menossi Teixeira

Texto do pedido de patente que será depositado no **INPI** (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

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

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

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

plant protoplasts following transformation with polyethyleneglycol. Exp Cell Res 170: 228-234) e o bombardeamento de partículas (**Klein TM, Wolf ED, Sanford JC (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327: 70–73**) são as mais utilizadas.

Nos últimos anos, tem-se obtido grande avanço nas tecnologias para a transformação de plantas e as pesquisas tem se voltado para a necessidade de desenvolver métodos eficazes de transformação genética das principais espécies de interesse experimental e econômico. A agrotransformação tem ganhado grande aceitação pela facilidade do método e a alta taxa de plantas transgênicas geradas. Por outro lado, o tabaco tem sido amplamente utilizado como modelo para estudos envolvendo transformação gênica pela facilidade de transformação e rápida obtenção de gerações transformadas. Desta forma, genes de diferentes espécies podem ser avaliados inicialmente em tabaco, pela facilidade e rapidez na produção e análise das plantas transgênicas. Isso tem ocorrido com genes de cereais, produtos hortícolas, plantas ornamentais e medicinais, árvores frutíferas, pastagens, dentre outros. Assim, embora o tabaco seja uma planta dicotiledônea, ele oferece evidências claras de que genes de monocotiledôneas, como cana-de-açúcar, milho, trigo e arroz, possam conferir tolerância a estresses abióticos tanto em plantas monocotiledôneas como dicotiledôneas.

Mais recentemente, com a chegada de novas tecnologias como o sequenciamento genômico e os microarranjos (**Mardis ER (2008) Next-generation DNA sequencing methods. Annu Rev Genomics Hum Genet 9: 387-402**) tem aumentado a quantidade de informação sobre os genes, até o ponto do patenteamento de genomas completos (**Stix G (2006) Owing the stuff of life. Sci Am**

294: 76-83 e Stott M, Valentine J (2003) Impact of gene patenting on R&D and commerce. Nat Biotechnol 21: 729-731; author reply 731). A partir dessas novas abordagens, um grande número de genes vem sendo identificado. Dessa forma, tem-se buscado cada vez mais o patenteamento de plantas ricas em alguns nutrientes e vitaminas, que apresentem aumento na produção ou na tolerância a estresses, entre outros.

Dentre os tipos de estresse, os abióticos tem tido um interesse particular para aplicação na agricultura devido ao efeito negativo sobre o desenvolvimento geral e a produtividade, bem como pelo temor às mudanças climáticas. Um dos tipos de estresse mais estudado e, conseqüentemente, com alto número de patentes é a seca, que é a principal causa de déficit hídrico ou estresse osmótico nas plantas (**Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, et al. (2008) Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. Field Crops Research 105: 1-14).**

Uma das mais recentes técnicas de análise de expressão gênica, denominada microarranjos ou chips de DNA, tem permitido associar função a genes até então desconhecidos. Essa técnica permite conhecer a expressão de centenas a milhares de genes distintos usando “tags” moleculares e marcações fluorescentes, que se são detectadas quando uma fita complementar derivada do RNA obtido dos tecidos vegetais em estudo se liga a um “tag”. Desta forma, os chips têm permitido conhecer e identificar genes envolvidos em diferentes processos da planta, como resposta a estresses abióticos, regulação gênica, acúmulo de sacarose, além de resistência a pragas, interação planta-patógeno e etc.

Dentre os diversos genes e polinucleotídeos identificados por nosso grupo como diferencialmente expressos sob condições de seca, o que codifica uma proteína com similaridade a ISP ("iron sulfur protein"), componente do complexo formador do citocromo b6f, foi selecionado e o seu papel na proteção contra estresses abióticos é revelado nesta invenção.

O complexo citocromo b6f é encontrado nas membranas dos tilacóides de plantas, cianobactérias e algas verdes (Greer, K. L. Golden, S. S. (1992) "Conserved Relationship between Psbh and Petbd Genes - Presence of a Shared Upstream Element in Prochlorothrix-Hollandica" *Plant Mol Biol* 19:355-365). Esse complexo contém quatro grandes subunidades incluindo o citocromo f, citocromo b6, o Rieske ISP e a subunidade IV, além de 4 pequenas subunidades hidrofóbicas: PetG, PetL, PetM e PetN. A subunidade Rieske ISP é uma das maiores encontradas no complexo e está envolvida na respiração e na transferência de elétrons na fotossíntese

Na fotossíntese, o complexo citocromo b6f está envolvido na transferência de elétrons entre os dois centros de reações fotossintéticas, a partir do fotossistema II para o fotossistema I. A atuação desse complexo ocorre durante a transferência de prótons do estroma do cloroplasto através da membrana do tilacóide. O transporte de elétrons via citocromo b6f é responsável por criar um gradiente de prótons que direciona a síntese de ATP nos cloroplastos (Kurusu, G.; Zhang, H.; Smith, J.L.; Cramer, W.A. (2003). "Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity." *Science* 302 (5647): 1009–14).

Os mecanismos de tolerância à seca em plantas têm semelhanças com outros tipos de estresses (Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) **Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold**

stresses. Annual Review of Plant Biology 57: 781-803), uma vez que as mesmas proteínas e osmoprotetores estão envolvidos em respostas moleculares para diferentes tipos de estresse. Adicionalmente, a maioria dos estresses abióticos começa com um tipo de estresse, por exemplo, o osmótico, que logo desencadeia os outros. Isto implica que um gene ou via de transdução de sinais identificada como de resposta a um estresse específico pode estar envolvido na resposta de vários outros tipos de estresse (**Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) e Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu Rev Plant Biol 53: 247-273**).

Ao nível celular, as membranas servem como uma barreira permeável para a perda de água e de algumas moléculas importantes. Assim, durante o estresse osmótico, a disponibilidade de água intercelular é restrita e as concentrações extracelulares de solutos são altas. Desta forma, ocorre um fluxo de água para fora das células, causando uma diminuição na turgência da célula e um aumento nas concentrações intracelulares de solutos. As espécies reativas de oxigênio e toxinas geradas durante esse processo também podem causar um dano extensivo para a célula.

Muitas são as patentes que descrevem diferentes proteínas capazes de conferir tolerância a fatores abióticos como seca e estresse salino. Uma família de proteínas com papel chave na regulação da transdução de sinal induzida pelo estresse é a dos elementos de ligação a DNA ativados em resposta a desidratação (DREB – “drought response element binding” ou CBF – “C-repeat/dehydration-responsive element binding factor”), (**Oh S, Song S, Kim Y, Jang H, Kim S, Kim M, Kim Y, Nahm B, Kim J. (2005). Arabidopsis CBF3/DREB1A and abf3 in transgenic Rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. Plant Physiology. 138:341-351;**

Stockinger E, Gilmour S, Thomashow M. (1997). Arabidopsis Thaliana CBF1 Encodes An AP2 Domain-Containing Transcription Activator That Binds To The C-Repeat/DRE, A Cis-Acting DNA Regulatory Element That Stimulates Transcription In Response To Low Temperature And Water Deficit. Proceedings of the National Academy of Sciences. 94:1035-1040). Proteínas CBF/DREB possuem diferentes domínios e foram identificadas em diferentes espécies. Os documentos **US7368630**, **US7259297** e **US7253000** utilizam estes importantes reguladores da transcrição para a produção de plantas transgênicas tolerantes ao estresse hídrico.

A patente **US7368630** descreve um método para a utilização do gene *DREB1A* na produção uma linhagem de células vegetais, tecidos ou plantas com este fator de transcrição, bem como os genes induzidos por desidratação identificados a partir de estudos de microarranjos. Por sua vez, o documento **US7259297**, descreve a produção de plantas transgênicas pela introdução de um gene que codifica um fator de transcrição DREB, que se liga ao elemento de resposta à seca DRE/CRT (“Drought Response Element/C repeat”) e ativa a transcrição de genes localizados em promotores com o referido motivo DRE. Segundo essa patente, a superexpressão do fator de transcrição DREB ativa os genes *Rd29A*, *Rd29B*, *Rd17*, *Rd22*, *DREB1A*, *Cor6*, *Cor15a*, *Erd1* e *Kin1*, induzindo uma resposta rápida da planta quando submetida ao estresse hídrico. E A patente **US7253000** descreve a utilização de uma sequência de ácido nucléico de um dos genes pertencentes ao grupo CBF protegendo seu uso na produção de plantas transgênicas para aumento de tolerância a estresses abióticos.

Outras patentes descrevem o uso de fatores de transcrição envolvidos na tolerância ao estresse como, por exemplo, a **WO2005024028** e **JP2006158402**, que empregam fatores de transcrição tipo “zinc finger” para conferir tolerância a estresse

hídrico nas plantas. Por sua vez, o documento **US2008163397**, descreve a utilização do domínio B do fator de transcrição *CAAT-binding*, para obtenção de plantas tolerantes a seca e ao estresse por frio. Da mesma forma, na patente **US2009265813** os autores descrevem a utilização do fator de transcrição AP2 para obtenção de plantas transgênicas relacionadas com múltiplas características, incluindo o crescimento reforçado da raiz e tolerância à seca como resultado final.

As patentes aqui mencionadas são reflexo do potencial biotecnológico dos genes que codificam fatores de transcrição, proteínas quinases e outras proteínas envolvidas nas respostas das plantas à seca. Essas proteínas atuam protegendo diretamente componentes celulares durante a desidratação, bem como amplificando o sinal molecular da percepção do estresse hídrico, permitindo a planta antecipar e acelerar os mecanismos de defesa. Nenhum documento apresenta proteção sobre sequências gênicas que codifiquem proteínas com alta similaridade a proteínas correspondentes à ISP (“iron sulfur protein”) que é componente do complexo formador do citocromo b6f, como é o caso da presente invenção.

Apesar do crescimento em pesquisas com cana-de-açúcar, são poucos os exemplos de invenções que utilizam genes de cana para produção de plantas com maior tolerância a estresses abióticos. Recentemente três pedidos de patente foram solicitados pelo nosso grupo (documentos **PCT/BR2011/000201** e **PCT/BR2011/000202** e protocolo de depósito **018110051091**) nos quais é reivindicado a proteção do uso de dois genes de cana-de-açúcar (*Scdr1* e *Scdr2*), que codificam proteínas de funções desconhecidas, capazes de conferir tolerância à seca e sal em plantas transgênicas de tabaco e um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo

com alta similaridade com a subunidade β da ATP sintase, que também confere tolerância à seca e salinidade em tabaco.

O uso de genes de cana que dão tolerância a estresses abióticos, em contraponto a genes de outras espécies, permite a produção de plantas transgênicas da cana contendo genes da própria cana, os quais têm maior aceitação pelos consumidores. De fato, 70% dos consumidores dão suporte a modificações genéticas envolvendo genes da própria espécie, em contraste com o suporte de 26% quando se tratam de genes de outras espécies (**Rommens CM (2010) Barriers and paths to market for genetically engineered crops. Plant Biotechnology Journal 8: 101-111**).

Portanto, esta invenção relaciona-se com a direta manipulação de uma sequência de DNA de cana-de-açúcar que codifica uma proteína com similaridade a ISP (“iron sulfur protein”) que é componente do complexo formador do citocromo b6/f de diversas espécies. Esta invenção descreve também a construção de um vetor para a expressão do referido gene de cana-de-açúcar, bem como um processo de produção de plantas transgênicas de forma a produzir um fenótipo de tolerância a estresse hídrico e salino, maior biomassa e maior fotossíntese, dentre outros possíveis.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve um método de produção de plantas que contém em suas células um gene de cana-de-açúcar e sua superexpressão leva à maior tolerância da planta a estresses abióticos.

Em uma forma mais ampla, a expressão do gene de cana-de-açúcar é regulada por um promotor e um terminador que funcionam em plantas. Mais especificamente, a presente invenção proporciona uma construção de DNA recombinante no sentido 5'

para 3', que compreende um promotor que funciona em plantas, operacionalmente ligado a um gene que codifica uma proteína de cana, operacionalmente ligado ao terminador que sinaliza o final da transcrição do gene e fornece um sítio de poliadenilação.

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

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

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

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

A presente invenção compreende a propagação das plantas geneticamente modificadas, com a finalidade de gerar sementes, plantar tais sementes no solo, ou brotação, como é o caso de uso de toletes em cana-de-açúcar, e que permite o crescimento das plantas sob condições de estresse. Mais especificamente, esta invenção fornece um método para produzir uma planta que tem como uma das características, tais como tolerância a estresses abióticos, aumento ou incremento no rendimento da massa fresca da planta, aumento ou incremento no rendimento da massa fresca de raízes. A invenção compreende as etapas de construção de uma molécula de DNA recombinante compreendendo um gene de cana-de-açúcar, inserção no genoma de uma célula de planta, obtenção de uma célula de planta transformada ou células transformadas, regeneração de plantas transformadas de células vegetais e seleção de plantas que apresentam melhores características agrônômicas. Uma das

características da invenção é o fato das plantas selecionadas apresentarem maior tolerância a estresses abióticos selecionado do grupo consistindo de tolerância ao estresse salino, tolerância à seca e sobrevivência após o a combinação de estresses abióticos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS E ANEXOS

Figura 1: Sequências utilizadas na transformação genética de tabaco. Sequência da região codificante (A) (SEQ ID NO: 1) e sequência de aminoácidos deduzidos (B) (SEQ ID NO: 2).

Figura 2: Alinhamento da sequência de aminoácido da proteína ISP de cana-de-açúcar com proteínas de outras espécies. Para o alinhamento foi utilizado o programa ClustalW2 nos parâmetros padrões.

Figura 3: Análise por PCR em tempo real da expressão do gene que codifica uma proteína de cana com similaridade a ISP (“iron sulfur protein”), que é componente do complexo formador do citocromo b6f, em amostras de duas variedades de cana-de-açúcar. Entre as variedades utilizadas a RB867515 é considerada tolerante à seca (T) enquanto a RB855536 é considerada sensível (S). As plantas foram cultivadas em campo com irrigação (I) ou sem (S) por 7 meses. As análises utilizaram duas réplicas biológicas, triplicata técnica e o gene da poliubiquitina de cana como gene endógeno. As barras correspondem ao “fold change” da expressão relativa do gene utilizando os dados da variedade sensível na condição de irrigação (SI) como referência. O gráfico ilustra a maior expressão do gene estudado na variedade tolerante e a indução por seca na variedade sensível.

Figura 4: Vetor binário pCAMBIA2301::H05 utilizado na agrotransformação de plantas de tabaco. Os cassetes de seleção, repórter e de expressão do polipeptídeo codificado pela SEQ ID: 1 foram clonados sob controle do promotor do vírus do mosaico da couve-flor CamV35S e utilizando o terminador do gene da nopalina sintase (NOS) de agrobactéria. Para a seleção foi utilizado o gene *nptII* que confere resistência ao antibiótico canamicina e como repórter o gene *uidA* que codifica a proteína β -glucuronidase (GUS). O vetor possui também a marca de seleção em bactéria para o antibiótico canamicina (Kana).

Anexo 1: Fases da transformação genética de tabaco. (A) Produção de explantes utilizados na transformação de tabaco. Sementes de tabaco selvagem foram germinadas em placas de Petri contendo meio Murashige-Skoog (MS) com 0,28% (w/v) de phytigel®. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16/8h luz/escuro ($300-400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 25°C e umidade relativa de 75–80%. (B) Discos foliares de tabaco após a infecção com agrobactérias e mantidas em placa contendo meio MS (suplementado com 1 mg/L de benzilaminopurina, 0,1 mg/L de ácido naftalenocético e 0,0059 g/L de acetoseringona) por 3 dias. (C) Os discos infectados em meio seletivo (sais MS, 1 mg/L de benzilaminopurina e 100 mg/L de canamicina). (D) Regeneração de plantas tolerantes ao antibiótico canamicina em placas contendo meio MS com 200 mg/L de canamicina. (E) Transferência das plântulas para fracos contendo meio MS para o alongamento e enraizamento.

Anexo 2: Detecção do DNA recombinante inserido no genoma de plantas de tabaco. Visualização de eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE corado com brometo de etídeo, sob iluminação de luz ultra-violeta. São observados os produtos da reação de PCR do gene *nptII* em 6 amostras de plantas transgênicas de tabaco, previamente

confirmadas pelo ensaio histoquímico de GUS (colunas de 1 a 6). Na coluna 7 foi analisada a amostra de uma planta não transgênica pelo teste histoquímico de GUS. A coluna C- corresponde a amostras de plantas selvagens, usadas como controle negativo. A coluna C+ a uma amostra do vetor pCAMBIA2301::H05 utilizado na transformação das plantas, como controle positivo.

Anexo 3: Análise fenotípica de plantas selvagens (não modificadas geneticamente) e transgênicas que possuem a SEQ ID NO: 1 após estresse hídrico. (A) Porcentagem de plantas sobreviventes após tratamento com suspensão de rega. Plantas de dois meses de idade foram privadas de água por 9 dias, reidratadas por 1 dia e novamente expostas a suspensão de rega por 15 dias e rehidratação por 3 dias. O experimento foi realizado com 6 réplicas biológicas e 3 linhagens transgênicas homozigotas e o número de plantas sobreviventes foi contado após a segunda rehidratação. (B) Aspecto das plantas analisadas após a segunda rehidratação. WT: plantas selvagens; 19.2, 13.5 e 4.5 indicam diferentes eventos de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO:1.

Anexo 4: Efeito de diferentes concentrações de NaCl em discos foliares de linhagens de tabaco transgênico contendo a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens. Foram analisadas plantas de tabaco de 3 linhagens contendo a SEQ ID NO: 1 e plantas selvagens com dois meses de idade. Os discos foliares foram tratados com 1 mL de meio MS líquido utilizando a metade dos reagentes recomendados suplementado com 0, 200, 300 ou 400 mM de NaCl por 4 dias. O experimento foi realizado com 4 réplicas biológicas contendo três discos de 0,5 cm de diâmetro por réplica. O conteúdo total de clorofila dos discos após o estresse salino foi extraído em 1 mL de acetona e quantificado. * indica a diferença estatística entre plantas transformadas e selvagens

para $P < 0,05$ e ** para $P < 0,01$. WT: plantas selvagens; 19.2, 13.5 e 4.5 indicam diferentes eventos de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO:1.

Anexo 5: Efeitos da suspensão de rega sobre a fotossíntese de plantas transgênicas que possuem a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens. Plantas de dois meses de idade de 3 linhagens transgênicas e plantas selvagens foram expostas à privação de rega por 9 dias seguido de 1 dia de reidratação. O experimento foi realizado com 5 réplicas biológicas de cada linhagem e a fotossíntese líquida foi medida a cada dois dias utilizando o equipamento IRGA (LCpro+; ADC bioscientific, Reino Unido). * indica a diferença estatística entre plantas transformadas e selvagens para $P < 0,05$ e ** para $P < 0,01$. WT: plantas selvagens; 19.2, 13.5 e 4.5 indicam diferentes eventos de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO:1.

Anexo 6: Efeito da suspensão de rega sobre a condutância estomática de plantas transgênicas que possuem a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens. O delineamento experimental realizado foi o mesmo descrito no anexo 5. WT: plantas selvagens; 19.2, 13.5 e 4.5 indicam diferentes eventos de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO:1.

Anexo 7: Efeito da suspensão de rega sobre a taxa de transpiração de plantas transgênicas que possuem a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens. O delineamento experimental realizado foi o mesmo descrito no anexo 5. WT: plantas selvagens; 19.2, 13.5 e 4.5 indicam diferentes eventos de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1.

Anexo 8: Efeito do estresse hídrico e salino sobre o desenvolvimento de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens. Dez sementes de 3 linhagens transgênicas foram germinadas em meio MS líquido suplementado ou não com 100 mM de NaCl ou 150 mM de manitol. O experimento foi realizado em triplicata

e após 20 dias sob agitação de 90 r.p.m., fotoperíodo de 16/8h de luz/escuro e temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, as plantas germinadas foram analisadas. (A) Peso fresco por planta submetida ao estresse hídrico através da exposição a 150 mM de manitol. (B) Peso fresco por planta crescida em meio MS não suplementado com manitol ou NaCl. (C) Peso fresco por planta submetida ao estresse salino através da exposição a 100 mM de NaCl.* indica diferença estatística entre plantas transformadas e selvagens com $P<0,05$ e ** para $P<0,01$. WT: plantas selvagens; 19.2, 13.5 e 4.5 indicam diferentes eventos de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1.

Anexo 9: Fenótipo visual de linhagens de tabaco que possuem a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens expostas aos estresses hídrico e salino. (A) Duas plantas com fenótipo representativo por evento independente de transformação e plantas selvagens expostas a 150 mM de manitol. (B) Duas plantas por evento de transformação e plantas selvagens expostas a 100 mM de NaCl. A escala está em centímetros e o delineamento experimental utilizado foi o mesmo descrito no anexo 8. WT: plantas selvagens; 19.2, 13.5 e 4.5 indicam diferentes eventos de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve um método para produção de plantas transgênicas tolerantes a estresses ambientais graças à introdução de um gene de cana-de-açúcar que codifica uma proteína com similaridade a ISP (“iron sulfur protein”), que é componente do complexo formador do citocromo b6f. A sequência de nucleotídeos do gene é descrita em SEQ ID NO: 1 (**Figura 1A**) e a sequência de aminoácidos deduzidos está indicada em SEQ ID NO: 2 (**Figura 1B**).

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

Como tal, as aplicações da invenção incluem, mas não estão limitadas, a melhoria da produção de plantas que sejam tolerantes a esses estresses abióticos. Da mesma forma, a invenção compreende as sequências com identidade igual ou superior a 50% à SEQ ID NO: 1, mas não limitantes a somente elas.

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

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

SEQ ID NO: 1 pode então ser usado para transformar uma célula vegetal, plantas ou partes de plantas por métodos convencionais de transformação.

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

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

O plasmídeo, de preferência, também inclui os promotores adequados para a expressão do ácido nucléico indicado na SEQ ID NO: 1 e também para a expressão do gene marcador de seleção, assim como do gene repórter. O promotor do vírus do mosaico da couve-flor 35S (CaMV 35S) é comumente utilizado na transformação de plantas, bem como o do gene da actina 1 de arroz (*act1*), da ubiquitina 1 (*ubi1*), o promotor do gene da alfa-amilase e promotores de genes induzidos por estresse. Na

presente invenção, o promotor utilizado é o promotor CaMV 35S, mas outros promotores também podem ser utilizados.

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

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

Para a produção de plantas transgênicas, qualquer método adequado para a transformação de monocotiledôneas ou dicotiledôneas pode ser usado, como, por exemplo, a transformação mediada por *Agrobacterium* ou bombardeamento de partículas (também conhecida como transformação de biolística ou biolística). Na transformação mediada por *Agrobacterium*, as células vegetais são colocadas em contato com um inóculo de bactérias transformadas com o plasmídeo contendo o DNA indicado na SEQ ID NO: 1 da invenção. Bactérias do gênero *Agrobacterium* que podem

ser utilizados para transformar células vegetais incluem espécies de *Agrobacterium rhizogenes* ou *Agrobacterium tumefaciens*, preferencialmente as cepas *A. tumefaciens* LBA4404, EHA105 ou GV301. *Agrobacterium* spp. são transformadas com o plasmídeo por métodos convencionais conhecidos.

Por sua vez, utilizando-se um protocolo de transformação de discos foliares, bactérias de *A. tumefaciens* com o DNA indicado na SEQ ID NO: 1, clonado em vetor binário, são cultivadas em um meio de crescimento na presença de antibióticos, como por exemplo, canamicina, para selecionar as células bacterianas que possuem o plasmídeo binário. Em seguida, folhas de tabaco selvagem são esterilizadas superficialmente, cortadas em pequenos discos e incubadas numa suspensão de *A. tumefaciens* por um tempo adequado. Diferentes tecidos podem ser utilizados para a transformação, tais como folhas, talo, flor dentre outros. Após a incubação com *A. tumefaciens* as folhas infetadas são transferidas para meio de cultura “in vitro” por determinado período de tempo. A seleção das plantas transgênicas é iniciada colocando-se as plantas infetadas no meio de seleção “in vitro” com antibiótico. Após o desenvolvimento de plântulas com raízes ocorre a transferência para solo e o crescimento em câmara de crescimento.

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

Outra abordagem para se aumentar os níveis de expressão de SEQ ID NO: 1 pode ser a produção de plantas geneticamente modificadas que superexpressem

genes que induzam a atividade do promotor do gene endógeno, como é o caso de genes que codificam fatores de transcrição.

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

Plantas transgênicas, de acordo com a invenção, incluem, sem limitação, os cereais, como trigo, cevada, milho, arroz, aveia, gramíneas forrageiras, turfa, outras monocotiledôneas como cana-de-açúcar, miscanthus, ou qualquer espécie de cultura de outros alimentos como o feijão, a soja, ervilha, tomate, colza, bem como outras espécies de interesse econômico, como o tabaco, a laranja, etc.

EXEMPLOS

Exemplo 1: ALINHAMENTO MÚLTIPLO ENTRE A SEQ ID NO: 1 E PROTEÍNAS DE OUTRAS ESPÉCIES.

Para verificar se a proteína codificada pela SEQ ID NO: 1 é conservada em outras espécies monocotiledôneas e dicotiledôneas utilizou-se o programa de alinhamento múltiplo ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) nos parâmetros padrão recomendados. O resultado obtido mostrou que a proteína codificada pela SEQ ID NO: 1 é altamente conservada entre as espécies (**Figura 2**).

Exemplo 2: AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DA SEQ ID NO: 1 DE CANA-DE-AÇÚCAR

Para avaliar o padrão de expressão do polinucleotídeo SEQ ID NO: 1 sob seca foi realizada um análise quantitativa por PCR em tempo real conforme descrito por Rocha *et al* (Rocha FR, Papini-Terzi FS, Nishiyama MY, Vencio RZN, Vicentini R, et al. (2007) **Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. BMC Genomics 8**). Para tal foram utilizadas amostras de RNA de folhas de uma variedade de cana com maior tolerância à seca (RB867515) e de outra com maior sensibilidade à seca (RB855536), cultivadas por 7 meses em campo, numa região de baixa pluviosidade, sob irrigação ou não (equivalente à estresse por seca). A amplificação foi realizada em triplicata com duas réplicas biológicas por variedade. Como gene de referência foi utilizado o gene da poliubiquitina de cana.

A expressão do polinucleotídeo SEQ ID NO: 1 foi determinada utilizando o programa qPCR (Pabinger S, Thallinger GG, Snajder R, Eichhorn H, Rader R, Trajanoski Z (2009) QPCR: Application for real-time PCR data management and analysis. BMC Bioinformatics 10: 268) e o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak KJ, Schmittgen TD (2001) **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. Methods 25: 402-408**), utilizando a amostra da variedade sensível sob irrigação como referência. A interpretação dos resultados baseou-se na premissa de que a razão da expressão do gene entre duas amostras (“fold change”) deveria ser de pelo menos dois para que o gene fosse considerado diferencialmente expresso naquela comparação.

O resultado da análise por PCR em tempo real mostrou indução na expressão do gene que contém a SEQ ID NO: 1 em condição de estresse por déficit hídrico na

variedade mais sensível (SS), comparada com a condição irrigada (SI) (**Figura 3**). Além disso, pode ser observado nesse gráfico que a variedade tolerante possui maior expressão do gene analisado em ambas as condições, quando comparado com a variedade sensível. Esses dados indicam que este gene pode estar relacionado à maior tolerância a seca da variedade RB867515 e que pode ser importante no mecanismo de resposta ao estresse na variedade RB855536, fatos estes confirmados pela presente invenção.

Exemplo 3: CLONAGEM DA SEQ ID NO: 1 DE CANA-DE-AÇÚCAR E PRODUÇÃO DE UM CASSETE RECOMBINANTE.

Um plasmídeo com a sequência codificante da proteína similar a proteínas ISP (“iron sulfur protein”) de cana-de-açúcar foi obtido do “Brazilian Clone Collection Center” (BCCCENTER, Jaboticabal, Brasil). A partir desse DNA a sequência codificante, indicada na SEQ ID NO: 1 (**Figura 1**), foi amplificada por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos, 5’ CCATGGCGACCTCCGCGG 3’ e 5’ GTGGAAGGCATGAGGTGACC 3’ e então clonada no vetor pGEMT-Easy (Promega, EUA). Posteriormente, um fragmento contendo a SEQ ID NO: 1 foi retirado do vetor pGEMT-Easy com a enzima *EcoR* I e inserido no vetor pRT104 digerido com a mesma enzima. A orientação da clonagem foi verificada por digestão enzimática e um clone com a região codificante clonada no sentido senso em relação ao promotor foi escolhido e validado por sequenciamento. O cassete de expressão foi então liberado pela digestão com *Hind* III e clonado no vetor de expressão pCAMBIA2301 (Cambia, Austrália), também digerido com a mesma enzima. A construção recombinante final resultante, pCAMBIA2301::H05 (**Figura 4**) foi introduzida em *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 .

Exemplo 4: PRODUÇÃO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

Sementes selvagens de tabaco (*Nicotiana tabacum*, var. SR1) foram germinadas em placas de Petri contendo meio Murashige-Skoog (MS) com 0,28% (w/v) de phytigel (Sigma, EUA). As plantas foram transferidas para potes e cultivadas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16/8h luz/escuro (300-400 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a $25\pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 75–80%.

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

Exemplo 5: ANÁLISES DA PRESENÇA DA SEQ ID NO: 1 EM PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS

A caracterização inicial das plantas enraizadas e transferidas para solo foi feita pelo ensaio histoquímico de GUS utilizando-se o substrato X-Gluc para a detecção do gene que codifica a proteína β -glucuronidase, presente no cassete de expressão inserido na planta.

Observou-se que um grande número de plantas apresentou forte coloração azul, as quais foram selecionadas para confirmação da integração do cassete de expressão contendo a SEQ ID NO: 1 por PCR, utilizando DNA genômico como molde.

Em seguida foi extraído DNA total de amostras de folha de plantas selvagens e plantas transgênicas. Para tal, coletaram-se cerca de 150 mg de folha, que foram macerados em microtubos de centrifuga com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bastante fino, ao qual acrescentaram-se 500 µL de tampão de extração (Tris 100 mM pH=8.0, EDTA 50 mM pH=8.0, NaCl 500 mM, β-mercaptoetanol 10 mM) seguido da adição de 35 µL de SDS 20%. Em seguida as amostras foram mantidas em banho-maria a 65°C por 10 minutos e 130 µL de acetato de potássio 5 M foram adicionados. Os tubos foram mantidos em gelo por 5 minutos e então centrifugados numa microcentrífuga a 15.000 x *g* durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo plástico de 1,5 mL contendo 640 µL de álcool isopropílico e 60 µL de acetato de sódio 3 M, misturado por inversão e incubado a -20°C por 10 minutos. Na sequência, os tubos foram centrifugados a 15.000 g durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O DNA precipitado foi lavado nos próprios tubos com 1 mL de álcool 70%, por três vezes. Por último, foram adicionados 100 µL de água ultrapura acrescida de RNase A 100 mg/mL seguido de incubação à 37°C por 30 minutos. O DNA genômico foi armazenado a 4°C.

A presença da construção de DNA contendo a SEQ ID NO: 1 (descrita na Figura 3) no DNA genômico extraído de plantas transgênicas de tabaco foi confirmada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) através da amplificação do gene *nptII*. Inicialmente foram utilizados 1,0 µL de DNA, 0,5 µL dNTP (10 mM), 1,0 µL MgCl₂ (25 mM), 0,75 µL de “primer” direto (10 µM), 0,75 µL “primer” reverso (10 µM), 2,5 µL

tampão Taq 10 x, 0,3 µL *Taq* polimerase (Fermentas, PAIS), 18,2 µL de água Milli-Q. Essa reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 10 minutos à 95°C, mais 35 ciclos de 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 65°C, 1 minuto à 72°C e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Os produtos dessa reação foram visualizados em gel de agarose 0,8% em TAE contendo brometo de etídeo, sob iluminação de luz ultra-violeta. Dentre as 6 amostras de plantas que apresentaram a coloração azul para o ensaio histoquímico de GUS, a presença do gene *nptII* foi confirmada em todas, sendo que uma planta negativa para GUS foi utilizada como controle negativo da reação de PCR (**Anexo 2**). Essas plantas foram utilizadas nos ensaios posteriores para observar os efeitos da SEQ ID NO: 1 nas características das plantas de tabaco transgênicas.

Exemplo 6: ANÁLISE DOS EFEITOS DA SUSPENSÃO DE REGA NAS PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS CONTENDO A SEQ ID NO: 1

Para verificar a resposta à suspensão de rega das plantas transgênicas em comparação com plantas selvagens foram utilizadas plantas de tabaco (geração T2) em que a homozigose do transgene foi verificada. Para isso sementes das linhagens homozigotas foram germinadas em placas de Petri contendo meio MS e, depois de cerca de 45 dias, as plantas foram transferidas para potes com 300 g de substrato Flores e Folhagens (BIOMIX) e mantidas sob condições normais de rega até atingirem 2 meses de idade. Esse procedimento foi realizado com plantas do tipo selvagem e com 3 linhagens de plantas transgênicas identificadas no Exemplo 5.

Plantas de dois meses de idade de três eventos de transformação independentes (denominados 4.5, 13.5 e 19.2) e também plantas selvagens com a

mesma idade foram expostas a 1 ciclo de suspensão de rega por 9 dias seguido de 1 dia de reidratação. Em seguida as plantas foram expostas a um novo ciclo de suspensão de rega por 15 dias seguido por 3 dias de reidratação. O experimento foi realizado com 5 réplicas biológicas de cada linhagem (transgênicas ou selvagem) e o número de plantas sobreviventes foi contado (**Anexo 3A**). A diferença entre o número de plantas que tiveram a capacidade de se recuperarem após o período de seca foi significativamente diferente entre as linhagens transgênicas e a selvagem. As linhagens transgênicas 4.5, 13.5 e 19.2 que contém a SEQ ID NO: 1 apresentaram as taxas de sobrevivência ao período de seca de 100%, 100% e 80%, respectivamente, enquanto a linhagem não transformada apresenta uma taxa de sobrevivência nula. O **Anexo 3B** mostra uma planta sobrevivente (transgênica) de cada evento e uma planta não sobrevivente (selvagem).

Estes dados mostram que a inserção de uma sequência quimérica que contém a SEQ ID NO: 1 de cana-de-açúcar em plantas de tabaco aumentou a tolerância dessas plantas à seca.

Exemplo 7: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE SALINO EM DISCOS DE PLANTAS TRANSGÊNICAS CONTENDO A SEQ ID NO: 1

Discos foliares de plantas de tabaco com 2 meses de idade e de 3 eventos transgênicos independentes (4.5, 13.5 e 19.2) que possuem a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens foram tratados com 1 mL de meio MS líquido meia força com 0, 200, 300 ou 400 mM de NaCl por 4 dias. O experimento foi realizado com 4 réplicas e após o período estresse salino procedeu-se a extração de clorofila através da maceração dos discos na presença de acetona seguida de sua quantificação como descrito por Arnon

(1949) (Arnon, D.I. (1949). *Plant Physiology* 24: 1-15). O estresse por NaCl causou uma redução no teor de clorofila em todas as plantas (**Anexo 4**). No entanto, os dados mostraram que a retenção da clorofila nos discos foliares dos eventos transformados com a SEQ ID NO: 1 é significativamente maior do que nos discos originados de plantas selvagens, quando tratados com 300 e 400 mM de NaCl e que não há diferença significativa nos tratamentos sem estresse e com 200 mM de NaCl (**Anexo 4**). Para a análise estatística foi aplicado o teste *t-Student*, sendo considerados como diferentes os valores que apresentaram um valor de $P < 0,05$.

Os dados acima descritos permitem concluir que plantas que receberam a inserção da SEQ ID NO: 1 apresentaram uma melhoria na tolerância ao estresse salino.

Exemplo 8: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS DE PLANTAS TRANSGÊNICAS CONTENDO A SEQ ID NO: 1 SUBMETIDAS A ESTRESSE HÍDRICO.

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

Plantas de dois meses de idade de três eventos independentes (4.5, 13.5 e 19.2) e selvagens foram expostas a privação de rega por 9 dias seguido de 1 dia de reidratação. O experimento foi realizado com 5 réplicas biológicas de cada linhagem

(transgênicas e selvagem) e os parâmetros fotossintéticos foram medidos a cada dois dias utilizando o equipamento IRGA (LCpro+; ADC Bioscientific, Reino Unido), numa concentração de CO₂ de 360 µL L⁻¹, intensidade de luz de 1000 µmol m⁻² s⁻¹, fluxo de gás 200 mL min⁻¹ e temperatura dentro da câmara de 25°C (**Guo Q, Zhang J, Gao Q, Xing S, Li F, et al. (2008) Drought tolerance through overexpression of monoubiquitin in transgenic tobacco. Journal of Plant Physiology 165: 1745-1755**).

Para estimar a condutância estomática de CO₂ (gs), taxa de transpiração (E) e fotossíntese (A), sob condições controle de estresse hídrico, foram utilizadas folhas completamente expandidas de três eventos independentes de plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 e de plantas selvagens. Os dados obtidos com as plantas transgênicas foram comparados com aqueles obtidos com as plantas selvagens através da análise estatística pelo teste *t-Student* sendo considerado como diferentes os valores que apresentaram um valor de P<0,05.

Todas as variáveis fisiológicas analisadas foram negativamente afetadas pelo estresse hídrico, tanto nas plantas selvagens como nas plantas transgênicas contendo a SEQ ID NO: 1 (**Anexos 5, 6 e 7**). No entanto, as plantas transgênicas apresentaram melhor desempenho nas análises fisiológicas realizadas.

A partir do terceiro dia de estresse, a taxa de fotossíntese (A) nas plantas transgênicas contendo SEQ ID NO: 1, submetidas a estresse hídrico, foi menos afetada (**Anexo 5**). Da mesma forma, tanto a condutância estomática (gs) (**Anexo 6**) como a taxa de transpiração (E) (**Anexo 7**) apresentaram um melhor desempenho a partir dos dias 7 e 3, respectivamente. Em resumo, foi observada uma clara diferença entre plantas transgênicas e selvagens em todos os parâmetros fotossintéticos avaliados em condições de seca.

As culturas agrícolas usualmente experimentam escassez de água em algum momento ao longo do seu ciclo de vida e, dependendo da duração e intensidade do estresse hídrico, podem ocorrer perdas expressivas na produtividade. Parâmetros importantes da fisiologia das plantas quando submetidas a estresse hídrico foram menos afetados naquelas que continham a SEQ ID NO: 1, comparativamente às plantas selvagens. Isto indica que a presente invenção contribui para a produção de plantas geneticamente modificadas com melhor performance em condições de escassez de água.

EXEMPLO 9: EFEITOS DOS ESTRESSES SALINOS E HÍDRICOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS QUE CONTÉM A SEQ ID NO: 1

Sementes de três eventos independentes de tabacos transgênicos que contém a SEQ ID NO: 1 e selvagens foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 10% por 20 minutos seguidos de três lavagens com água Milli-Q autoclavada. Dez sementes de cada genótipo foram esterilizadas superficialmente e inoculadas em Erlenmeyers de 250 mL contendo meio líquido Murashige-Skoog (MS) suplementado ou não com 100 mM de NaCl ou 150 mM de manitol, mantidos sob agitação constante de 90 r.p.m em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16/8h luz/escuro (300-400 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O experimento foi realizado em triplicata e após 20 dias avaliou-se o desempenho das plantas sob os diferentes tratamentos, através da análise visual e do peso fresco por planta. Eventos transgênicos portadores de SEQ ID NO: 1, quando expostos ao estresse hídrico por manitol apresentaram maior peso fresco por planta (**Anexo 8A**), o que é reflexo do seu melhor desenvolvimento das

partes aérea e radicular (**Anexo 9B**). As plantas transgênicas que contém a SEQ ID NO: 1, quando expostas ao meio sem estresse mostraram peso fresco superior ao observado na linhagem não transformada (**Anexo 8B**), o que sugere que em condições normais as plantas transgênicas possuem melhor desempenho em seu crescimento comparando-se com as plantas selvagens. O tratamento com NaCl não apresentou diferença significativa no peso fresco entre transgênicos e selvagens (**Anexo 8C**). O padrão de desenvolvimento observado nas partes aéreas e radiculares das plantas de tabaco sob condições de estresse salino e manitol é apresentado nos **Anexos 9A e 9B**, respectivamente. Os resultados descritos neste exemplo apresentam mais uma evidência de que as plantas transgênicas portadoras da SEQ ID NO: 1 possuem maior tolerância a seca comparando-se com as plantas selvagens.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produção de plantas geneticamente modificadas, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:
 - a) Produção de um vetor que compreenda a sequência de nucleotídeos de interesse descrita em SEQ ID NO: 1;
 - b) Produção de um vetor em que a sequência descrita em SEQ ID NO: 1 esteja operacionalmente ligada a um promotor funcional em plantas;
 - c) Produção de um vetor em que a sequência descrita em SEQ ID NO: 1 esteja operacionalmente ligado a um terminador funcional em plantas;
 - d) Inserção do dito vetor compreendendo a sequência descrita em SEQ ID NO: 1, o promotor e o terminador no genoma de célula vegetal, planta ou partes de plantas.

2. Método para produção de plantas geneticamente modificadas, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:
 - a) Produção de um vetor que compreenda pelo menos 60% de identidade com a sequência descrita em SEQ ID NO: 1;
 - b) Produção de um vetor em que a sequência com pelo menos 60% de identidade com a sequência descrita em SEQ ID NO: 1 esteja operacionalmente ligada a um promotor funcional em plantas;
 - c) Produção de um vetor em que a sequência com pelo menos 60% de identidade com a sequência descrita em SEQ ID NO: 1 esteja operacionalmente ligado a um terminador funcional em plantas;

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

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

22. Vetor, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado pelo** promotor ser preferencialmente o promotor CaMV 35 S do vírus do mosaico do couve-flor.
23. Vetor, de acordo com as reivindicações 14 e 16, **caracterizado por** conter um terminador operacionalmente ligado à sequência polinucleotídica de interesse.
24. Vetor, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado pelo** ácido nucléico que codifica o terminador ser, preferencialmente, o da nopalina sintase (NOS).
25. Vetor, de acordo com as reivindicações 14 e 16, **caracterizado por** poder conter um gene marcador.
26. Vetor, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado pelo** gene marcador ser preferencialmente o gene *nptII*.
27. Vetor, de acordo com as reivindicações 14 e 16, **caracterizado por** poder conter um gene repórter.
28. Vetor, de acordo com as reivindicações 14 e 16, **caracterizado por** ser capaz de permitir a transferência de DNA para célula vegetal, planta ou partes de plantas.
29. Uso do método descrito nas reivindicações de 1 a 13 **caracterizado por** ser aplicado para produção de célula vegetal, planta ou partes de planta.
30. Uso do método descrito nas reivindicações de 1 a 13 **caracterizado por** ser aplicado para produção de sementes a partir de plantas que contém a sequência de interesse descrita em SEQ ID NO: 1.
31. Uso do método descrito nas reivindicações de 1 a 13 **caracterizado por** ser aplicado para produção de sementes a partir de plantas que contém sequência de interesse com pelo menos 60% de identidade com a descrita em SEQ ID NO: 1.

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

1 CAAAGATATA GTTAGTGCCC CCGGGGGCTC ATCCGCAAGC CTGTGGACGC
51 CAGGGAGTGA ACACCAGCCG TCTTGCCCCG ACTCCGACCG ATCCTCACCT
101 GCTGCAGCCA TGGCGACCTC CGCGGCGCTC TCCACCGCCG CCAACCCAC
M A T S A A L S T A A N P T
151 CCAGCTCTGC CGGTCCC GCGCTACGCTGGG CAAGCCAGCG AAGGGGCTTG
Q L C R S R A T L G K P A K G L G
201 GCCTGGGGAT GGGCCGGGAG CGCGCCCAGA GCATCACGTG CCAGGCGGCG
L G M G R E R A Q S I T C Q A A
251 AGCAGCATCC CCGCCGACCG CGTCCCCGAC ATGGAGAAGC GGAAGCTGAT
S S I P A D R V P D M E K R K L M
301 GAACCTCCTC CTCCTGGGCG CCATCTCGCT GCCACCGTC GGCATGGTCG
N L L L L G A I S L P T V G M V V
351 TCCCCTACGG CGCCTTCTTC GTCCCCGCGG GCTCCGGCGG CGCCGGCGGC
P Y G A F F V P A G S G G A G G
401 GGGACCTACG CCAAGGACAA GCTGGGCAAC GACATCACGG TGGATGAGTG
G T Y A K D K L G N D I T V D E W
451 GCTCAAGACG CACGGTCCCA ACGACCGCAC GCTCGCGCAG GGGCTCAAGG
L K T H G P N D R T L A Q G L K G
501 GTGACCCAC GTACCTGGTG GTGGAGCAGG ACAAGACGCT GGCCACCTAC
D P T Y L V V E Q D K T L A T Y
551 GGGATCAACG CCGTGTGCAC TCACCTCGGC TGCCTCGTGC CGTGGAAATAG
G I N A V C T H L G C V V P W N S
601 CGCCGAGAAC AAGTTCATCT GCCCCTGCCA CGGGTCCCAG TACAACAACC
A E N K F I C P C H G S Q Y N N Q
651 AGGGCAAGGT GGTCCGTGGA CCGGCGCCTC TGTCGCTGGC CCTGGTTCAC
G K V V R G P A P L S L A L V H
701 GCCGACGTCG ACGACGGCAA GGTCCCTCTTC GTCCCGTGGG TGGAGACCGA
A D V D D G K V L F V P W V E T D
751 CTTCAGGACC GGCAGGACC CGTGGTGGAA GGCATGAGGA GGATCCGACA
F R T G E D P W W K A *
801 CCAGCGGTGC TCAGTGCTCA CATATGACCT ATGTATGCGT TCGTTCTCCG
851 AGGGCGTTGT TGCTACAAAT TCACTTGCTT CTTGCCTCCA AATTATATAT
901 ATGTACACAC ACTGTATGAA ACAATAACAT CTGTTTCTCA TATCTTCGTA
951 TACTAGTACA TTGCGCGCGC CTTGCGCGC GG

Figura 1

```

Nicotiana      MASSTLSPVT--QLCSSKSGLSSVS-QCLLVKPMKINSHGLGKDKR----MKVKCMAT-S 52
Arabidopsis   MASSSLSPAT--QLGSSRSALMAMS-SGLFVKPTKMNHQMVRKEKIG---LRISQAS-S 53
Vitis         MG-----NGVLSFS-HALLPKLTRMS-PFVGKKGK---LKIKQAT-S 37
Glycine       MASTTLSPTTPSQLCSGKSGIFSSS-QALLVKPVKR--QMMGKSKG---LRIACQAT-S 52
Saccharum     MATSAALSTA----ANPT-QLCRS-RATLGKPAKGLGLGMGRERAQ----SITCQAASS 49
Sorghum       MATTAALSTA----ANPTHQLCRS-RATLGKPVKGLGLGMGRERAQ----SITCQAASS 50
Zea           MATSAALSTA----ANPT-QLCRS-RASLGKPVKGLGLSMGRERAQR---SIVCQAASS 50
Triticum      MAS-TALSTA----SNPT-QLCRTRASSLCKPVK--GLGFGREIRIPR---NITCMAG-S 47
Brachypodium MAS-TALSTA----SNPT-RLCRP-LPSLGKPVK--GLGFAREIRIPR---NITCMAG-S 46
Oriza         MAS-TALSTA----SNPT-QLCRS-RASLGKPVK--GLGFGREIRVPRATTITCQAASS 50
* . . . . . : * : . : : : * * *

Nicotiana      IPADDRVPDMEKRNLMNLLLLGALSPLTAGMLVPYGTFFVPPGSGGGSGGTPAKDALGND 112
Arabidopsis   IPAD-RVPDMEKRKTLNLLLLGALSPLTGYMLVPYATFFVPPGTGGGGGGTPAKDALGND 112
Vitis         IPAN-RVPDMGKRKLMNLLLLGVVSLPSAGMLIPYATFFAPPGTGSAGGGTVAKDALGND 96
Glycine       ISAD-RVPDMGKRQLMNLLLLGALSPLTAGMLIPYTYFFVPPGSGSSAGGTVAKDAVND 111
Saccharum     IPAD-RVPDMEKRKLMNLLLLGALSPLTVGMVVPYGAFFVVPAGSGGAGGGTYAKDKLND 108
Sorghum       IPAD-RVPDMEKRKLMNLLLLGALSPLTVGMVVPYGAFFVVPAGSGGAGGGTYAKDKLND 109
Zea           ISAD-RVPDMEKRKLMNLLLLGALSPLTVGMVVPYGAFFVVPAGSGNAGGGTYAKDKLND 109
Triticum      ISAD-RVPDMSKRELMNLLLLGALSPLTFGMLVPYGSFLVPAGSGSNAGGVAAKDKLND 106
Brachypodium ISAD-RVPDMSKRELMNLLLLGALSPLTFGMLVPYGSFLVPAGSGSNTGGTVAKDKLND 105
Oriza         IPAD-RVPDMGKRQLMNLLLLGALSPLTVGMLVPYGAFFIPAGSGNAGGGQVAKDKLND 109
* . * : * * * * * * : * * * * * : * * * * * * : * * * * * * * * * * * *

Nicotiana      VIASEWLKTHPPGNRTLQGLKGDPTYLVVENDGTLATYGINAVCTHLGCVVPFNAAENK 172
Arabidopsis   VVAEWLKTHGPGDRTLQGLKGDPTYLVVENDKTLATYGINAVCTHLGCVVPWNKAENK 172
Vitis         VIADEWLKTHGPDRTLQGLKGDPTYLVVEDDKTLATYGINAVCTHLGCVVPWNTAENK 156
Glycine       VIAENWLKAHGPDRTLQGLKGDPTYLVVEKDRTLATFAINAVCTHLGCVVPWNAENK 171
Saccharum     ITVDEWLKTHGPNDRTLAQGLKGDPTYLVVEQDKTLATYGINAVCTHLGCVVPWNSAENK 168
Sorghum       ITVDEWLKTHGPNDRTLAQGLKGDPTYLVVEQDKTLATYGINAVCTHLGCVVPWNGAENK 169
Zea           ITVEAWLNTHGPNDRTLAQGLKGDPTYLVVEQDKTLATYGINAVCTHLGCVVPWNGAENK 169
Triticum      ILVEDWLKTHGPNDRTLAQGLKGDPTYLVVESDKTLATYGINAVCTHLGCVVPWNAENK 166
Brachypodium ILVEEWLKTHGPNDRTLAQGLKGDPTYLVVEADKTLATYGINAVCTHLGCVVPNTAENK 165
Oriza         VLAEEWLKTHGPNDRTLQGLKGDPTYLVVEADKTLATYGINAVCTHLGCVVPWNAENK 169
: . * * : * * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Nicotiana      FICPCHGSQYNNQGRVVRGPAPLSLALAHADIDD-GKVVFPVWVETDFRTGEDPWWA- 228
Arabidopsis   FLCPCHGSQYNAQGRVVRGPAPLSLALAHADIDEAGKVLFPVWVETDFRTGDAPWWS- 229
Vitis         FICPCHGSQYNNQGRVVRGPAPLSLALAHADIDD-GKVVFIWVWVETDFRTGEDPWWA- 212
Glycine       FICPCHGSQYNDQGRVVRGPAPLSLALAHCDIDD-GKVVFPVWVETDFRTGDAPWWA- 227
Saccharum     FICPCHGSQYNNQKVVVRGPAPLSLALVHADVDD-GKVLFPVWVETDFRTGEDPWWKA 225
Sorghum       FICPCHGSQYNNQKVVVRGPAPLSLALVHADVDD-GKVLFPVWVETDFRTGEDPWWKA 226
Zea           FICPCHGSQYNNQKVVVRGPAPLSLALVHADVDD-GKVLFPVWVETDFRTGEDPWWKA 226
Triticum      FLCPCHGSQYNNQKVVVRGPAPLSLALVHADVDD-GKVVFPVWVETDFRTGDNPWVK- 222
Brachypodium FLCPCHGSQYNNQKVVVRGPAPLSLALVHADVDD-GKVVFPVWVETDFRTGENPWVK- 221
Oriza         FICPCHGSQYNNQGRVVRGPAPLSLALVHADVDD-GKVLFPVWVETDFRTGDNPWWA- 225
* : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 2

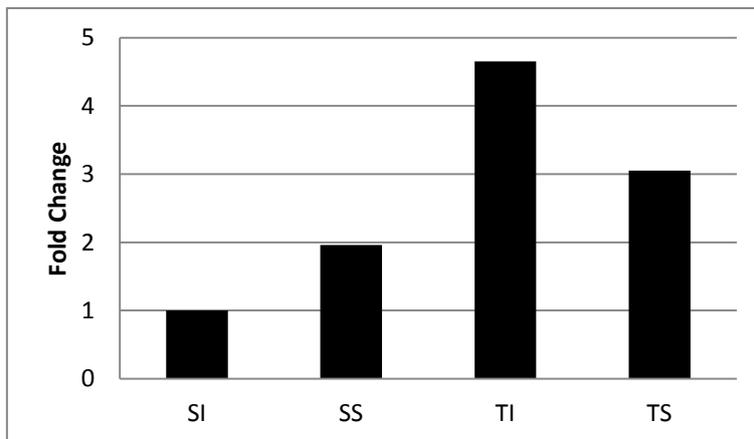
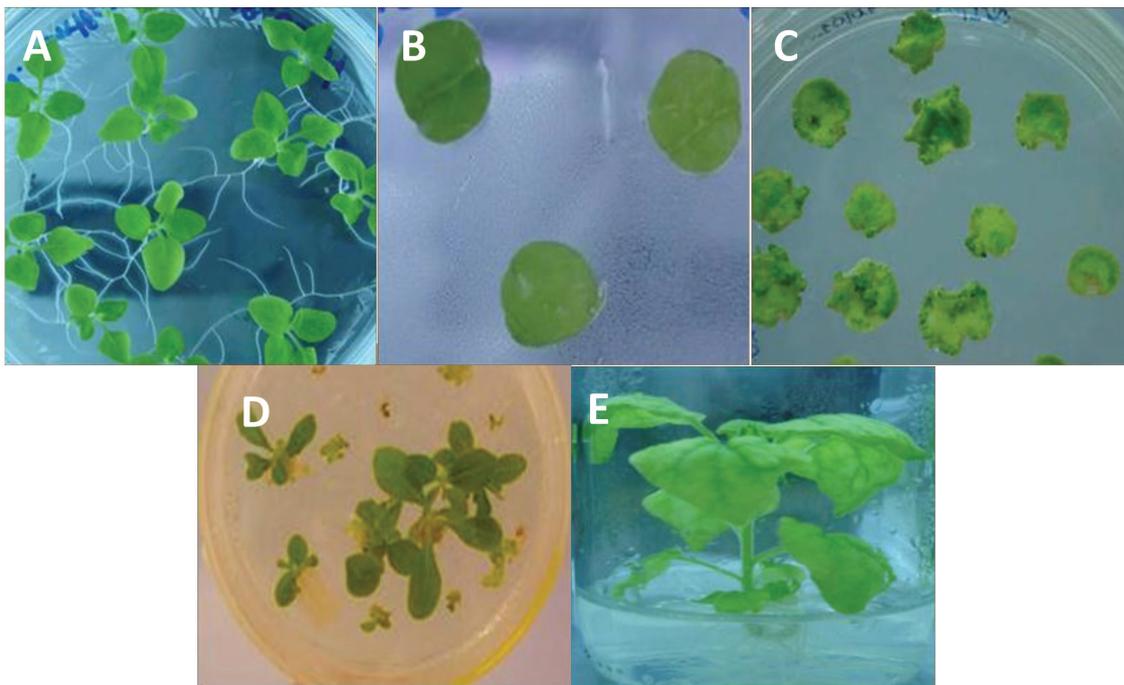


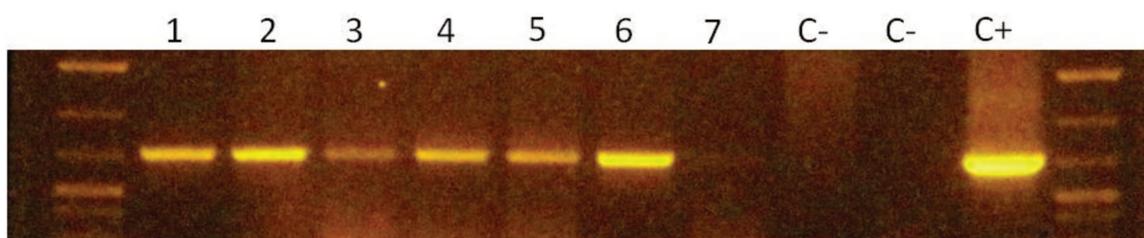
Figura 3



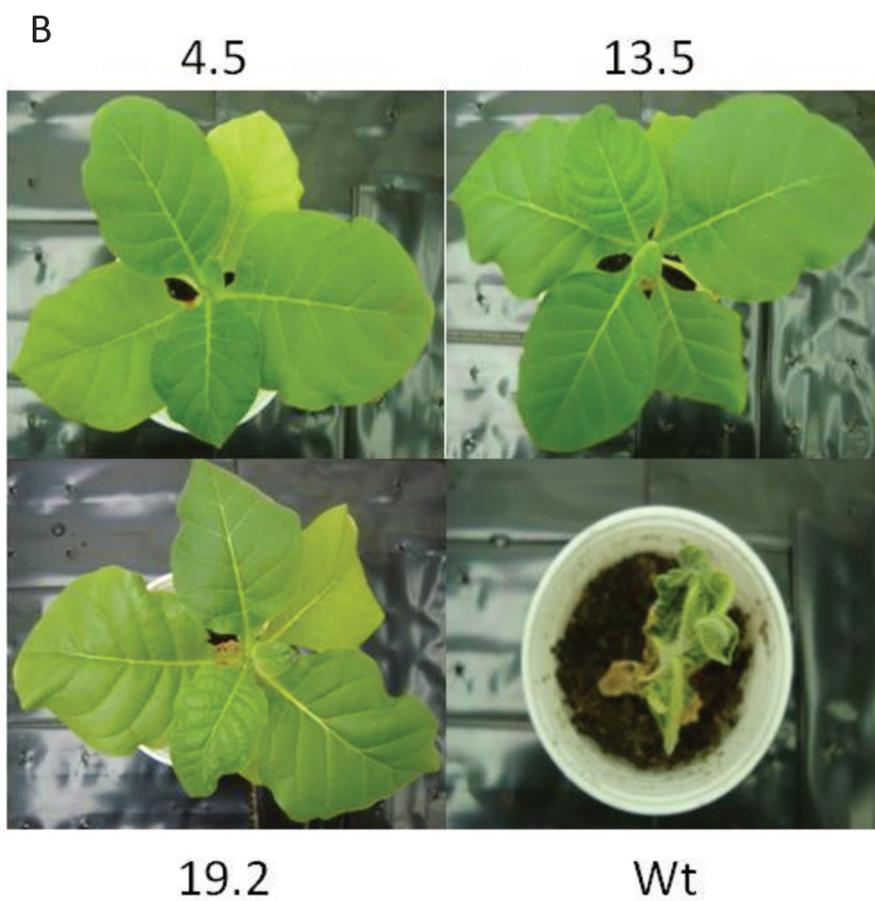
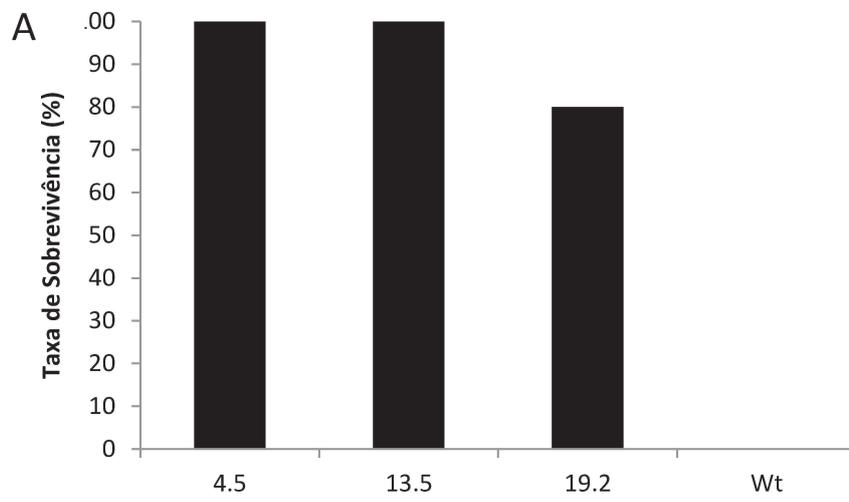
Figura 4



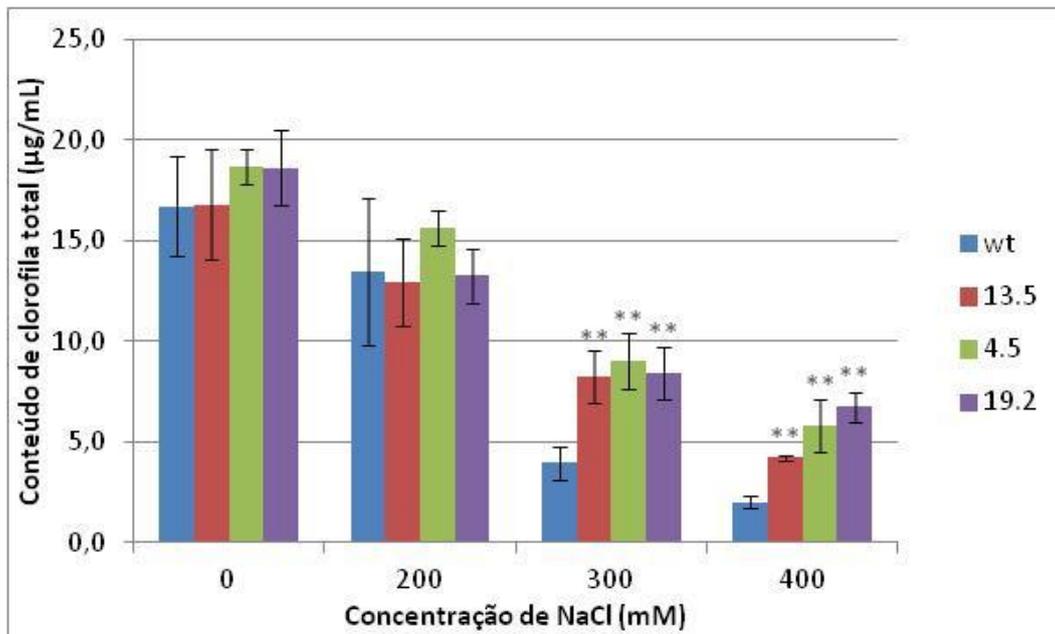
Anexo 1



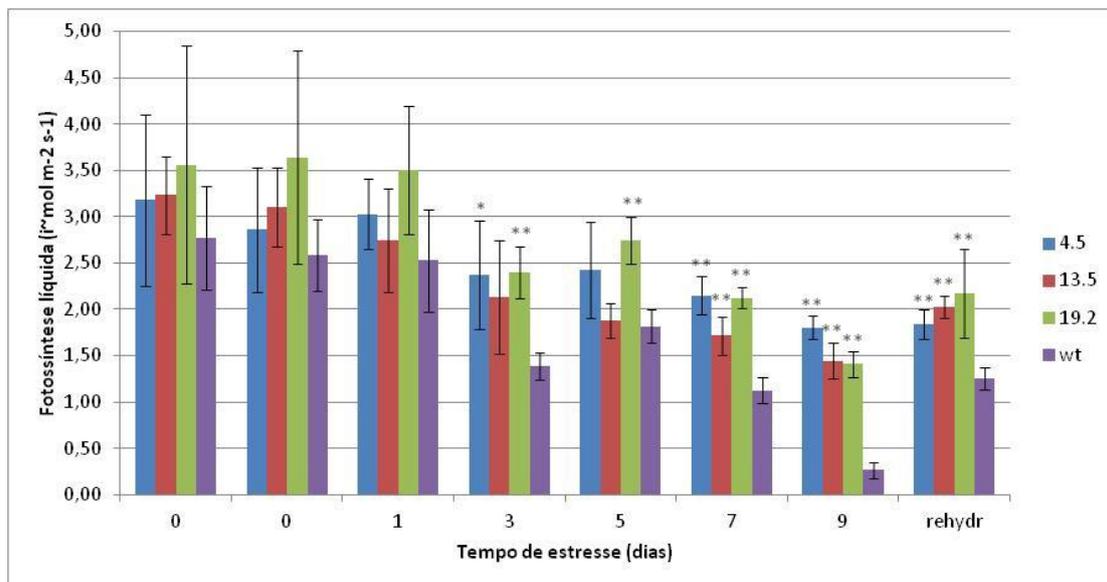
Anexo 2



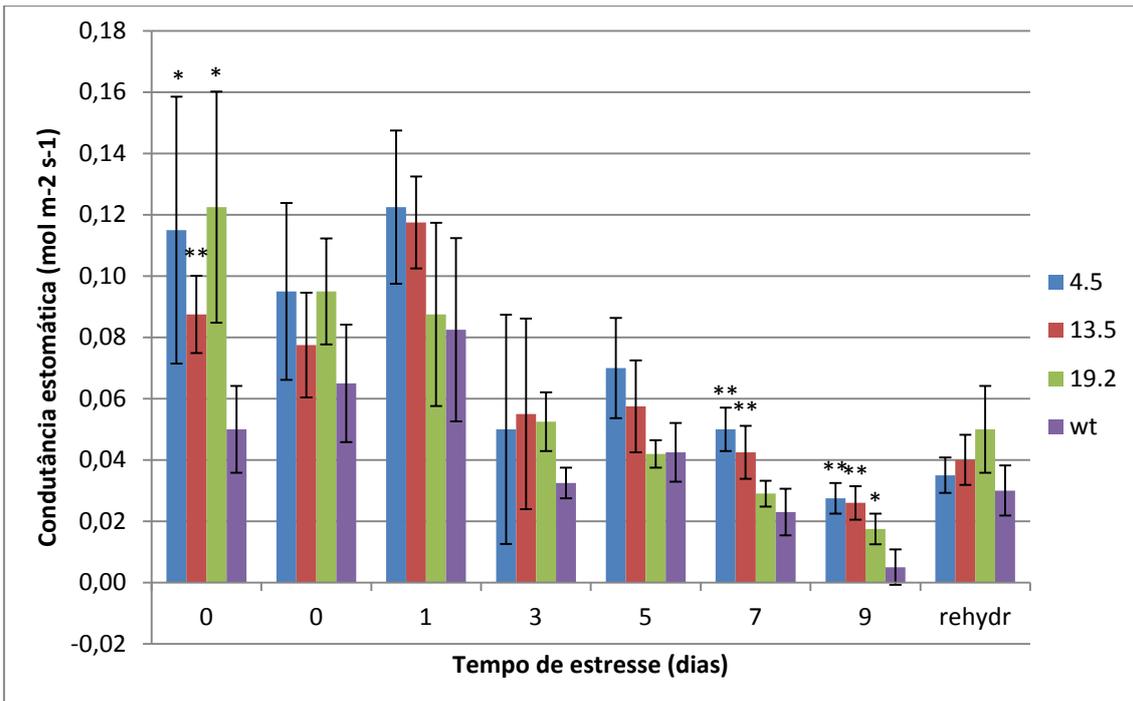
Anexo 3



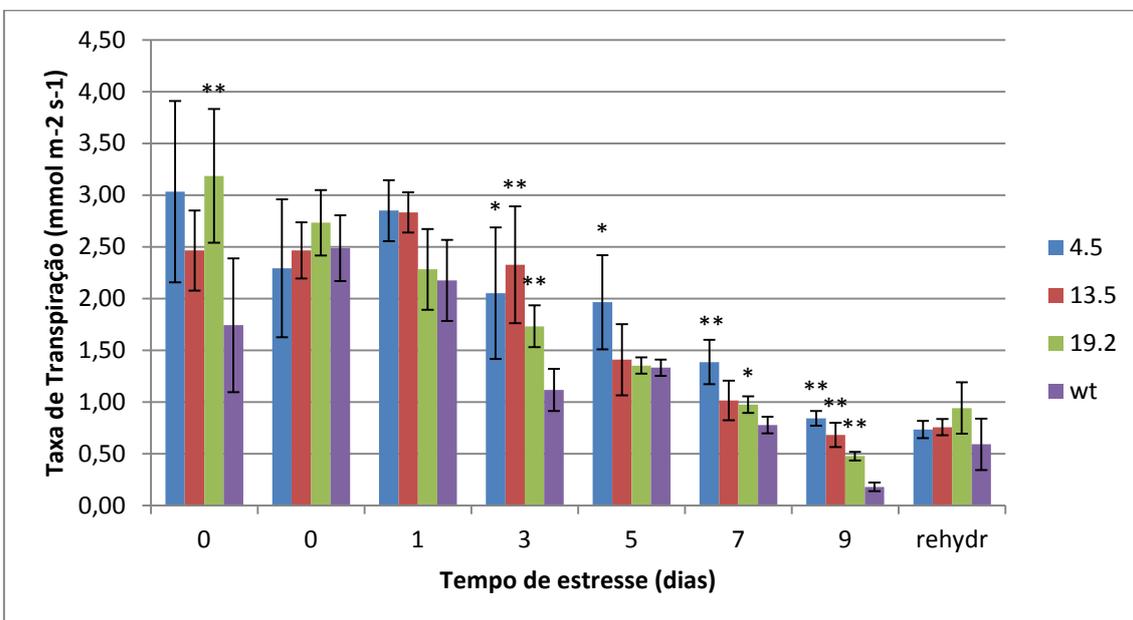
Anexo 4



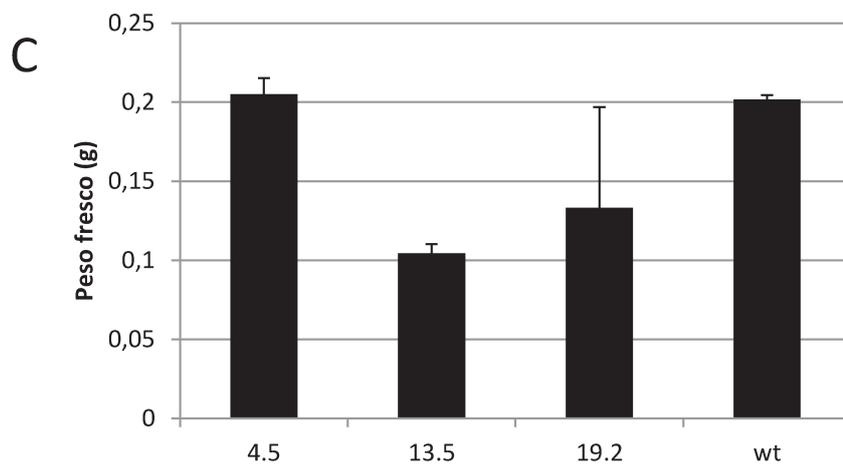
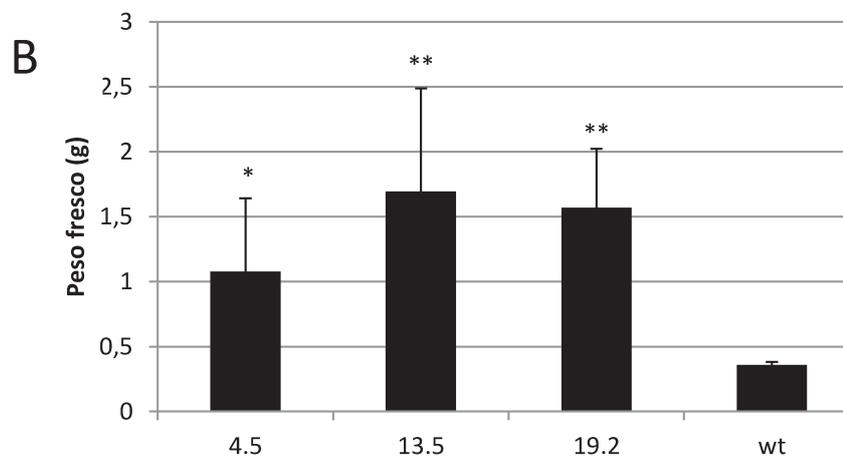
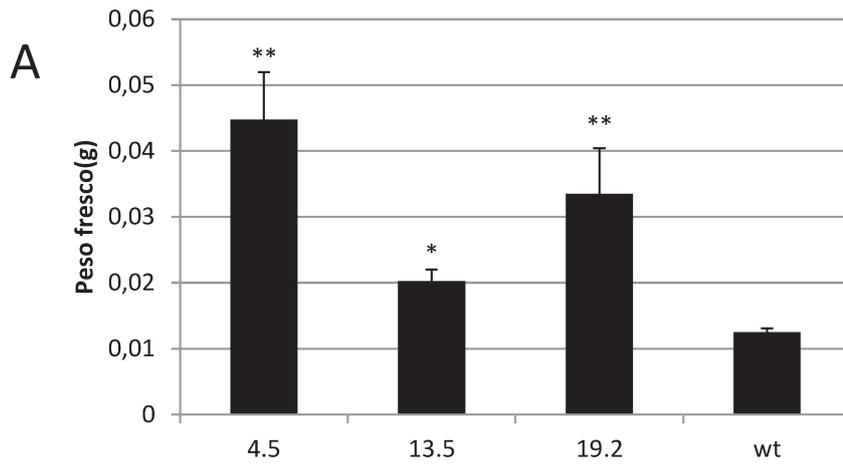
Anexo 5



Anexo 6



Anexo 7



Anexo 8



Anexo 9

3

Superexpressão de um gene que confere tolerância a estresse oxidativo em cana-de-açúcar transgênica

César Bueno de Souza, Andrea Akemi Hoshino, Giane Carolina Bueno, Ilse Fernanda Ferrari e Marcelo Menossi Teixeira

Introdução

A cana-de-açúcar possui um papel importante na economia brasileira e a expansão da área cultivada, em paralelo ao aumento da produtividade por área, vem ao encontro com a atual demanda por energia. Em um cenário no qual o uso sustentável da água é necessário e a produção de cana se expandindo para a região centro-norte, estudos para a produção de novos cultivares que possuam melhor desempenho sob condições de irrigação reduzida ou chuvas escassas ganham especial atenção.

A biotecnologia é uma importante estratégia nos estudos de tolerância a seca e vários trabalhos têm demonstrado que a superexpressão de genes envolvidos na resposta a estresses abióticos aumentam a tolerância a esses estresses. Gao et al. (2011) mostraram que a superexpressão de um gene de arroz com função desconhecida, *OsSDIR1*, aumenta grandemente a tolerância a seca em plantas transgênicas de arroz. Plantas de tabaco transgênicas superexpressando um fator de transcrição de soja, *GmERF3*, possuem tolerância aumentada a estresses bióticos e abióticos (Zhang et al., 2009). Begcy et al. (2011) mostraram que plantas de tabaco que superexpressam uma proteína de Arabidopsis são mais tolerantes aos estresses hídrico e salino e estas mesmas plantas já haviam sido relatadas anteriormente como tolerantes ao estresse oxidativo (Brandalise et al., 2003). Molinari et al. (2007) mostraram que plantas transgênicas de cana-de-açúcar que superexpressam um gene de *Vigna aconitifolia* envolvido na biossíntese de prolina apresentam tolerância a estresse oxidativo.

Microarranjos de DNA são uma ferramenta com grande potencial na identificação e no estudo da expressão gênica e muitos são os trabalhos que identificam genes modulados por estresses bióticos e abióticos através dessa técnica (Cuming et al., 2007; Rocha et al., 2007; Luo et al., 2010). Muitos dos genes modulados por seca identificados por microarranjos de DNA ainda não foram caracterizados e não têm função conhecida. Esses genes são alvos interessantes para estudos de biotecnologia, pois podem se tratar de genes específicos da espécie e/ou tem maior possibilidade de proteção. Uma vez que a transcrição desses genes desconhecidos é aumentada ou diminuída por estresses abióticos, como a seca, é muito provável que seu papel esteja ligado à resposta a esses estresses. No trabalho publicado por Rocha

et al. (2007), 93 genes de cana-de-açúcar foram identificados como diferencialmente expressos sob condições de seca e dentre esses 13,9% não possuem função atribuída. Dois destes genes de função desconhecida foram analisados por superexpressão em plantas de tabaco e ambos conferiram aumento na tolerância a estresses hídrico e salino. A proteção do uso desses genes está sendo solicitada (Menossi et al., 2011, 2011).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivos estabelecer um protocolo de transformação genética de cana-de-açúcar e avaliar o potencial biotecnológico de um gene de cana que foi identificado como induzido por seca (Rocha et al., 2007), mas tem função desconhecida.

Material e métodos

Por questões de Propriedade Intelectual, o nome do “cluster” utilizado, bem como, as sequências de nucleotídeos, aminoácidos e “primers” foram omitidos.

Obtenção e confirmação do gene candidato

O gene-alvo candidato foi selecionado a partir do trabalho publicado por Rocha et al. (2007) e, em seguida, um estoque bacteriano contendo o plasmídeo com o gene alvo foi solicitado ao “Brazilian Clone Collection Center” (BCC Center). As bactérias foram estriadas em placa de Petri contendo meio LB com ampicilina 50 µg/mL e incubadas a 37°C pelo período de 16 horas. Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio de cultura LB líquido e incubada a 37°C por 16 horas sob agitação de 250 r.p.m. Uma alíquota de 850 µL da cultura bacteriana foi separada e acrescida de 150 µL de glicerol 50% (w/v) e armazenada a -80°C para estoque permanente. O restante da

suspensão bacteriana foi utilizada para minipreparação de DNA plasmidial por lise alcalina utilizando o “QIAprep Spin Miniprep Kit” (Qiagen®), segundo orientações do fabricante. O plasmídeo extraído foi confirmado por digestão com as enzimas *EcoR* I e *BamH* I (Fermentas®).

Construção do vetor de expressão

A região codificante do gene alvo foi amplificada por PCR através do uso de “primers” desenhados nas regiões 5’ e 3’. A reação de PCR utilizou a enzima “Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity” (Life technologies®). O produto correspondente ao tamanho esperado (687 pb) foi extraído do gel de agarose 1%, purificado com o Kit GeneJET™ (Fermentas®) e clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega®).

O inserto candidato foi retirado do vetor pGEM-T easy (Promega®) com a enzima *EcoRI* (Fermentas®) e as extremidades coesivas foram preenchidas (“fill-in”) pela enzima “Klenow Fragment” (Fermentas®) (DNA, 1 X Klenow Buffer, 1 U “Klenow fragment”). A reação foi incubada a 37°C, por 30 minutos. Em seguida, os fragmentos foram novamente separados em gel de agarose 1% e o produto com o tamanho esperado foi extraído e purificado com o Kit GeneJET™ (Fermentas®).

O vetor pUBILN (Camargo, 2007) correspondente ao vetor pAHC17 (Christensen and Quail, 1996) modificado, foi linearizado com a enzima *EcoRV* (Fermentas®) para receber o inserto. O produto da digestão foi separado em gel de agarose 1% e o fragmento correspondente ao vetor foi extraído e purificado com o Kit GeneJET™ (Fermentas®).

Os fragmentos contendo o gene alvo e o vetor pUBILN linearizado foram então ligados pela ação da enzima T4 DNA ligase (Fermentas[®]), a 22°C, por 16 horas. Este vetor intermediário foi denominado pUBILN::*gene alvo*.

O vetor pAHC20 (Christensen and Quail, 1996) foi utilizado para amplificação por PCR do conjunto Ubi-1::bar com a enzima “Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity” (Life technologies[®]). Nesta amplificação foram inseridos sítios de restrição para as enzimas *Bst*XI e *Xho*I (Fermentas[®]). Para isso foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos: *Bst*X_UBI_FW (5´ CCACCATGTTGGAAGCTTGCATG 3´) e *bar_Xho*I_RV (5´ CTCGAGTCAAATCTCGGTGAC 3´). O produto da amplificação, de aproximadamente 2,6 Kb, foi recuperado de gel de agarose 1%, purificado com o Kit GeneJET[™] (Fermentas[®]) e subclonado no vetor pGEM-T Easy (Promega[®]). Em seguida, o bloco Ubi::bar foi retirado deste vetor através da digestão com as enzimas *Bst*XI e *Xho*I (Fermentas[®]) e posteriormente ligado pela enzima T4 DNA ligase (Fermentas[®]) ao vetor pCAMBIA3301 (CAMBIA), digerido com as mesmas enzimas. Nesse momento o vetor foi denominado pC3301::UBI::bar.

O vetor pC3301::UBI::bar, bem como o vetor pUBILN::*gene alvo*, foi digerido com a enzima *Hind*III (Fermentas[®]). O vetor pC3301::UBI::bar linearizado e o conjunto Ubi::*gene alvo*::NOS foram recuperados do gel de agarose 1%, purificados com o Kit GeneJET[™] (Fermentas[®]) e, posteriormente, ligados pela enzima T4 DNA ligase (Fermentas[®]). Ao vetor final foi atribuída a nomenclatura pC3301::*gene alvo* que foi confirmado por digestões enzimáticas com as enzimas *Kpn*I e *Hind*III (Fermentas[®]) e teve sua sequência validada por sequenciamento.

Transformação genética de cana-de-açúcar via biolística

Foi estabelecida uma parceria com o grupo da Profa. Dra. Monalisa Sampaio da Universidade Federal de São Carlos – Campus de Araras, que gentilmente cedeu o material vegetal para os experimentos de transformação. Ponteiros de plantas saudáveis de cana-de-açúcar cultivar RB835486 com aproximadamente 7 meses de idade foram esterilizados com etanol 70% (v/v) e transferidos para fluxo laminar para sua manipulação. As folhas foram removidas até a obtenção do palmito (aproximadamente 0,3 cm de diâmetro) e cortadas transversalmente produzindo fragmentos com 2 – 3 mm de espessura. Os cortes foram realizados com o palmito imerso em solução estéril de ácido cítrico 500 mg/L. Os discos obtidos foram transferidos para meio de cultura indutor de calos MSC que corresponde ao meio basal MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 25 g/L de sacarose, 3 mg/L de 2,4-D (2,4-ácido diclorofenoxiacético), 100 mg/L de inositol, 150 mg/L de ácido cítrico, solidificado com 2 g/L de phytigel (Sigma®) e com o pH ajustado para 5,8 conforme modificações de Arencibia et al. (1998). As culturas foram mantidas a 26±2°C no escuro e os calos embriogênicos foram selecionados e cultivados por intervalos de 2 semanas no mesmo meio de cultura. Após três ou quatro ciclos de cultivo, os calos embriogênicos foram utilizados nos experimentos de transformação.

Nos experimentos de transformação utilizou-se o vetor pC3301::*gene alvo* que contém a seqüência codificadora do gene *bar*, da enzima fosfinotricina-N-acetiltransferase (PAT), que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio (Finale®, Bayer), sob controle do promotor do gene da poliubiquitina (*Ubi-1*) de milho e a região codificadora do gene *alvo* de cana-de-açúcar, que é induzido por seca, também sob controle do promotor *Ubi-1*.

Para os experimentos de bombardeamento os calos de cana-de-açúcar foram mantidos em meio osmótico (MSC acrescido de 72,88 g/L de manitol e 72,88 g/L de sorbitol) por cerca de quatro horas. A precipitação dos plasmídeos pC3301::*gene alvo* sobre as micropartículas de tungstênio seguiu o procedimento descrito por Rech et al. (2008). O bombardeamento foi realizado com auxílio da Profa. Helaine Carrer, no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC/ESALQ/USP), utilizando o aparelho *PDS-1000He Biolistics™ Particle Delivery System* (Bio-Rad). A placa de Petri contendo os calos embriogênicos foi colocada a 11 cm da membrana carreadora, foram utilizadas membranas de ruptura para pressão de 1100 psi e dois disparos por placa foram realizados. Aproximadamente duas horas após o bombardeamento os calos foram transferidos para meio MSC e mantidos por 15 dias no escuro à $26\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Após esse período, os calos foram transferidos para meio de seleção e regeneração (MSR), que consiste do meio MSC suplementado com 1,2 mg/L do hormônio 6-benzilaminopurina (BAP), 30 mL/L de água de côco e 1,7 mg/L do herbicida Finale®, e mantidos sob fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$.

As plantas regenerantes foram transferidas para frascos contendo meio seletivo de enraizamento e alongamento (MSEA) que corresponde ao meio basal MS suplementado de 0,4 g/L de carvão ativado e 2 mg/L do herbicida Finale®. As plantas resistentes ao herbicida foram transferidas para o substrato Flores e Folhagens (BIOMIX) e mantidas em casa-de-vegetação para o desenvolvimento e posterior análise de tolerância a estresses abióticos.

Transformação genética de cana-de-açúcar via agrobactéria

A produção de calos embriogênicos para agrotransformação foi realizada conforme descrito anteriormente. Nos experimentos de agrotransformação foi utilizada a cepa EHA105 de *A. tumefaciens*, contendo o vetor pC3301::*gene alvo*. A cultura foi estriada em placa de Petri contendo meio LB sólido suplementado com 100 mg/L de rifampicina, 100 mg/L de kanamicina e 300 mg/L de estreptomicina e incubada no escuro à $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 2 dias. Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido suplementado com os antibióticos descritos anteriormente e mantida sob agitação (250 r.p.m.) até atingir D.O. (600 nm) = 0,6. Em seguida, 2 mL desta cultura foram inoculados em 150 mL de meio LB com os mesmos antibióticos e mantidos sob agitação de 250 r.p.m. até D.O. (600 nm) = 0,6. A suspensão bacteriana foi precipitada por centrifugação, ressuspendida em meio de infecção (meio MS suplementado com 25 g/L de sacarose, 100 mg/L de inositol, 150 mg/L de ácido cítrico e 100 μM de acetoseringona) num volume adequado para obter D.O. (600 nm) = 0,2. A solução de infecção foi incubada à $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, 250 r.p.m., por 2 horas e utilizada na infecção de cerca de 250 calos, sob leve agitação, durante 30 minutos.

Após a infecção, os calos foram mantidos no escuro por 2 dias a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ em meio de co-cultivo (MSCO, meio MSC suplementado com 100 μM de acetoseringona) e depois transferidos para meio de descanso (MSD, meio MSC com 200 mg/L de ticarcilina) onde permaneceram por 15 dias antes de iniciarem o processo de regeneração e seleção. O processo de regeneração e seleção de plantas transformadas por agrobactéria foi o mesmo descrito para biolística sendo os meios acrescidos de 200 mg/L de ticarcilina para controlar o crescimento de agrobactéria.

Desafio de resistência ao herbicida

As plantas regeneradas a partir dos experimentos de agrotransformação e biolística foram borrifadas com 200 mg/L do herbicida Finale® e os efeitos do tratamento sobre as folhas foram avaliados visualmente.

Análise da expressão do gene *bar*

Cerca de 50 mg de tecido fresco dos eventos resistentes ao herbicida Finale® foram usados para avaliar a expressão do gene *bar* com o kit TraitCheck (Gehaka) segundo orientações do fabricante.

Análise da integração do transgene por PCR

O DNA genômico das plantas resistentes ao herbicida Finale® e de plantas selvagens foi extraído a partir de amostras de folha. Para tal, foram coletadas cerca 150 mg de folha, que foram maceradas em microtubos de centrífuga com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bastante fino, ao qual foram acrescentados 650 µL de tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH = 8,0, EDTA 20 mM pH = 8,0, PVP 10000 1% e β-mercaptoetanol 0,2%). As amostras foram agitadas vigorosamente e mantidas em banho-maria à 65°C por 40 minutos. Após esse período foram adicionados 650 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram agitadas até a formação de uma emulsão.

Em seguida, os tubos foram centrifugados por 20 minutos, 14000 r.p.m. a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e o mesmo volume de álcool isopropílico foi adicionado. As amostras foram incubadas por 30 minutos a -80°C e

centrifugadas por 10 minutos, 14000 r.p.m a 4°C. O DNA precipitado foi lavado nos próprios tubos com etanol 70% por duas vezes, ressuspendido em 50 µL de água ultra pura acrescida de RNase A 100 mg/mL e incubado à 37°C por 30 minutos. A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. O DNA genômico foi armazenado a 4°C.

A presença do gene *bar* no DNA genômico extraído de plantas transgênicas de cana-de-açúcar foi confirmada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os “primers” direto 5’ ATGAGCCCAGAACGACGCC 3’ e reverso 5’ CAAATCTCGGTGACGGGCAG 3’. Foram utilizados 2 µL de DNA, dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 2 mM, 0,3 mM de cada “primer”, tampão *Taq* 1 x, 1U de *Taq* Polimerase (Fermentas®) e água Milli-Q q.s.p. 25 µL. Essa reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 10 minutos à 95°C, mais 35 ciclos de 1 minuto à 95°C, 1 minuto à 60°C, 1 minuto à 72°C e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

O produto dessa reação foi visualizado em gel de agarose 0,8% em TAE contendo brometo de etídeo, sob iluminação de luz ultra-violeta.

Análise da expressão do gene alvo em plantas transgênicas por PCR em tempo real

Para avaliar a expressão do gene alvo nas plantas transgênicas de cana-de-açúcar validadas por PCR, foi realizada uma análise quantitativa por PCR em tempo real. Amostras de RNA de folhas dos eventos e de 10 plantas selvagens foram extraídas utilizando o “RNeasy Mini Kit” (Qiagen), segundo recomendações do fabricante. A qualidade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo

e pelo aparelho Nanodrop2000 (Thermo Scientific), que também foi utilizado para a quantificação do RNA.

Alíquotas de 1,2 µg de RNA de cada evento foram tratadas com DNase I (Fermentas), de acordo com as recomendações do fabricante, num volume final de 13,2 µL. Em seguida, 1 µL de cada RNA tratado foi utilizado para confirmação da eficiência do tratamento, através da amplificação do gene da poliubiquitina (Rocha et al., 2007). As reações consistiram de uma mistura de 1 x SyBr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 0,2 µM de cada “primer”, além da alíquota de RNA. A amplificação foi realizada pelo aparelho 7500 Real Time PCR System SDS (Applied Biosystems), seguindo o programa: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Por último o aparelho realizou a análise da curva de “melting”, denaturando e reanelando todos os produtos obtidos. As amostras que não apresentaram amplificação no RNA tratado com DNase I foram transcritas utilizando oligo d(T)₁₇VN e a enzima “SuperScript® III Reverse Transcriptase” (Life Technologies), segundo as recomendações do fabricante.

A expressão do gene alvo foi avaliada utilizando “primers” desenhados dentro da região codificante e a amplificação foi realizada em triplicata, utilizando 2 µL de cDNA diluído (1:5) por reação, nas condições descritas anteriormente. O gene da poliubiquitina de cana foi utilizado como gene endógeno. Os dados foram analisados segundo o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001), utilizando as amostras das plantas selvagens como referência. Para serem considerados diferencialmente expressos os eventos deveriam apresentar expressão relativa pelo menos 3 vezes maior que as plantas selvagens.

Avaliação da resposta ao estresse oxidativo

Discos foliares de onze plantas transgênicas e três selvagens medindo 0,5 cm de diâmetro foram tratados com 1 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas concentrações: 0, 0,25, 0,5, 0,75 e 1 M, por 36 horas. O experimento foi realizado com 4 réplicas compostas de 3 discos foliares cada. Após o período de estresse oxidativo procedeu-se a extração da clorofila total através da maceração dos discos na presença de acetona, seguida de sua quantificação como descrito por Arnon (1949). O conteúdo de clorofila total obtido para os eventos transgênicos foi comparado com aquele obtido para as plantas selvagens através do teste estatístico *t-Student*.

Resultados

Escolha do gene alvo e construção do vetor de expressão

O gene candidato analisado neste trabalho foi selecionado a partir da lista de “clusters” diferencialmente expressos sob seca publicada por Rocha et al. (2007). Este “cluster” de função ainda desconhecida foi denominado gene alvo para os propósitos desta tese.

O plasmídeo contendo o gene alvo foi obtido junto ao BCC Center, validado por digestão enzimática e utilizado na construção do vetor de expressão para cana. O vetor final pC3301::alvo (Figura 1) foi validado por digestão enzimática e sequenciamento.

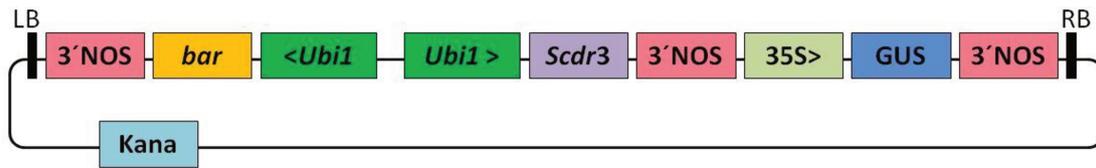


Figura 1 – Esquema teórico do vetor utilizado nas transformações genéticas de cana-de-açúcar. O vetor pC3301::alvo contém os genes *bar* e alvo clonados sob controle do promotor *Ubi1* de milho e terminador 3' NOS. O cassete repórter possui o gene *uidA* sob controle do promotor CamV35S e terminador 3' NOS. O plasmídeo possui também o gene de resistência ao antibiótico canamicina em bactéria (Kana).

Transformação genética de cana-de-açúcar

Ponteiros do cultivar RB845486 de cana-de-açúcar (Figura 2A) foram gentilmente cedidos pelo grupo da Prof. Dra. Monalisa Sampaio (UFSCar – Araras/SP), as folhas externas foram retiradas (Figura 2B) e após processo de desinfecção, os mesmos foram descascados até a obtenção do palmito (Figura 2C).

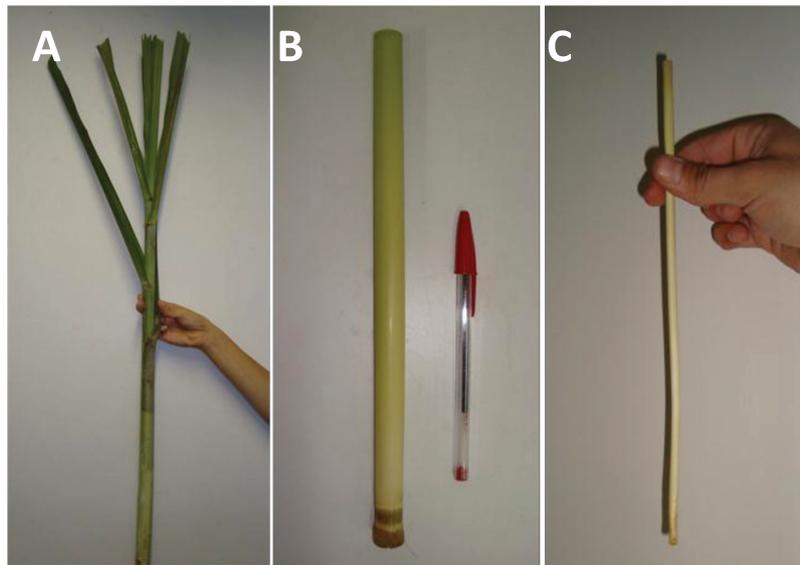


Figura 2 – Ponteiro de cana-de-açúcar sendo preparado para inoculação. Logo após a coleta (A), preparado para a desinfecção (B) e palmito pronto para a inoculação (C).

A Figura 3A ilustra o corte dos explantes em solução antioxidante de ácido cítrico 500 mg/L. Discos de aproximadamente 0,3 cm de diâmetro foram transferidos para meio indutor de calos (MSC). A Figura 3B mostra o aspecto dos explantes alguns dias após a inoculação em MSC.

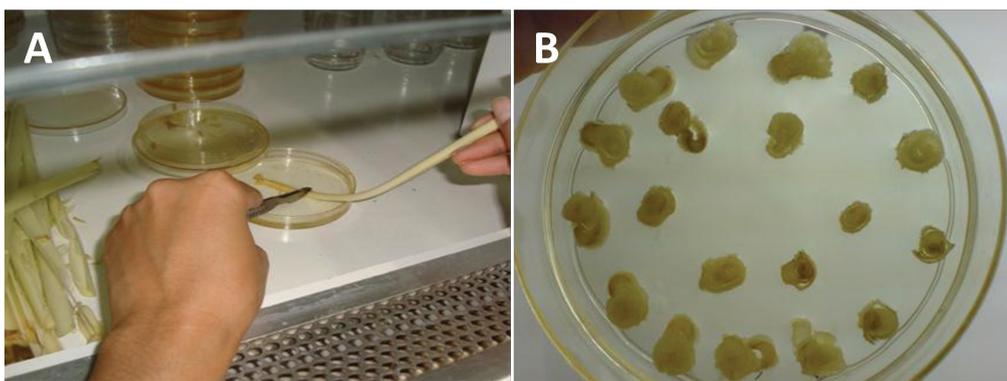


Figura 3 – Etapas do processo de inoculação de explantes de cana-de-açúcar. Corte dos explantes em solução de ácido cítrico (A) e discos foliares alguns dias após a inoculação (B).

Após três ou quatro ciclos de cultivo em MSC a formação de calos embriogênicos foi eficaz e os mesmos foram selecionados e utilizados nos experimentos de transformação. A Figura 4 apresenta o aspecto geral dos calos obtidos após alguns ciclos de multiplicação “in vitro”.

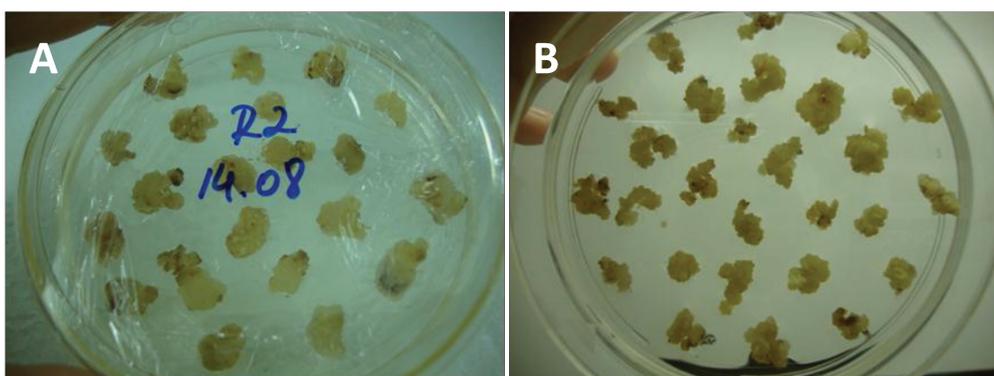


Figura 4 – Aspecto geral da cultura de calos embriogênicos utilizados na transformação de cana-de-açúcar. Calos embriogênicos após dois (A) e quatro (B) ciclos de multiplicação “in vitro”.

Os calos bombardeados ou agroinfectados foram transferidos para o meio MSR e após dois ou três ciclos de regeneração e seleção foram obtidas as primeiras plântulas. Os calos regenerantes foram mantidos em MSR até emitirem folhas quando foram transferidos para meio seletivo de alongamento e enraizamento (MSEA). A Figura 5 ilustra as etapas do processo completo de regeneração e seleção “in vitro” de plantas transgênicas de cana-de-açúcar.

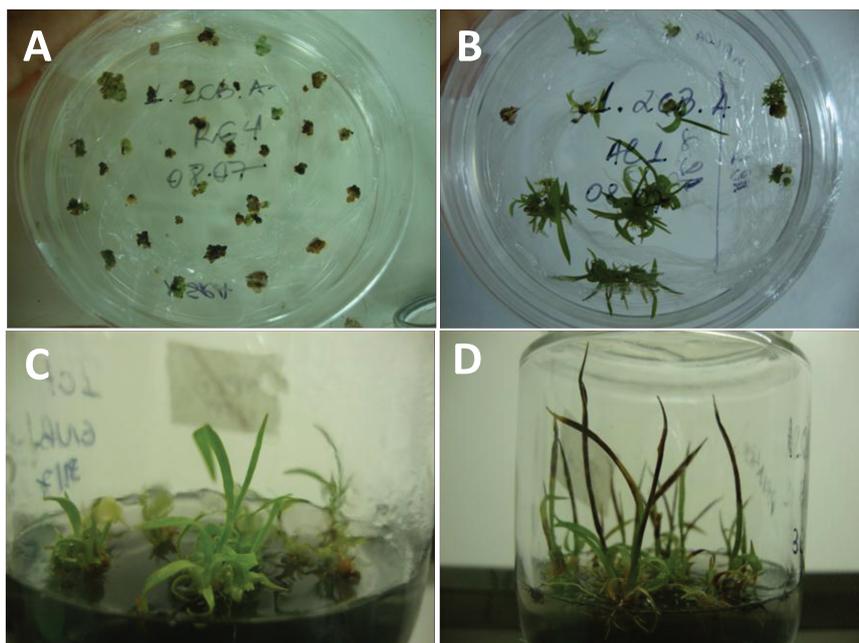


Figura 5 – Regeneração e seleção de plantas transgênicas de cana-de-açúcar. Pontos verdes visualizados em calos após 30 dias da transformação (A). Plântulas regenerantes após 60 dias (B). Plântulas em meio MSEA no dia em que foram transferidas (C). Plântulas em meio MSEA após 15 dias da transferência onde claramente é possível visualizar os efeitos do aumento da dosagem do herbicida Finale®.

Após a transferência para o meio MSEA a maioria das plantas regenerantes apresentou sintomas claros de susceptibilidade ao herbicida. Apenas 128 plantas obtidas via biolística e 16 obtidas via agrobactéria mostraram-se resistentes à concentração de 2 mg/L do herbicida Finale® (Tabela 1). Essas plantas foram transferidas para o substrato Biomix Flores e Folhagens e mantidas em casa de vegetação.

Tabela 1 – Eficiência de seleção e análise molecular de eventos de cana-de-açúcar transformados com o gene alvo. Número de plantas resistentes a dosagens de herbicida “in vitro” e em casa de vegetação e de plantas confirmadas por PCR e PCR em tempo real, obtidas pelos métodos de biolística e agrotransformação.

Método	N° plantas Biolística	N° plantas Agrobactéria
Herbicida 2 mg/L	128	16
Herbicida 200 mg/L	31	5
PCR genômico	10	1
PCR em tempo real	10	1
Eficiência de seleção*	7.81%	6.25%

* A eficiência de seleção foi calculada pela razão entre a quantidade de plantas confirmadas pelas resistentes à concentração de 2 mg/L do herbicida Finale®.

Desafio de resistência ao herbicida

As plantas resistentes “in vitro” a 2 mg/L de Finale® já transferidas para substrato foram desafiadas com 200 mg/L do herbicida para eliminar possíveis escapes. Apenas 31 plantas provenientes de bombardeamento e 5 de agrotransformação apresentaram nenhum ou poucos sintomas do herbicida (Tabela 1). As demais plantas secaram completamente e foram devidamente descartadas.

Detecção da expressão do gene *bar*

Análises de amostras foliares das plantas sobreviventes ao herbicida Finale®, utilizando o Kit TraitCheck (Gehaka), foram eficazes na detecção da proteína PAT para alguns dos eventos gerados (Figura 6). Os resultados obtidos, contudo, não foram considerados confiáveis, pois algumas plantas não transformadas, utilizadas como controle negativo, também apresentaram resultados positivos.

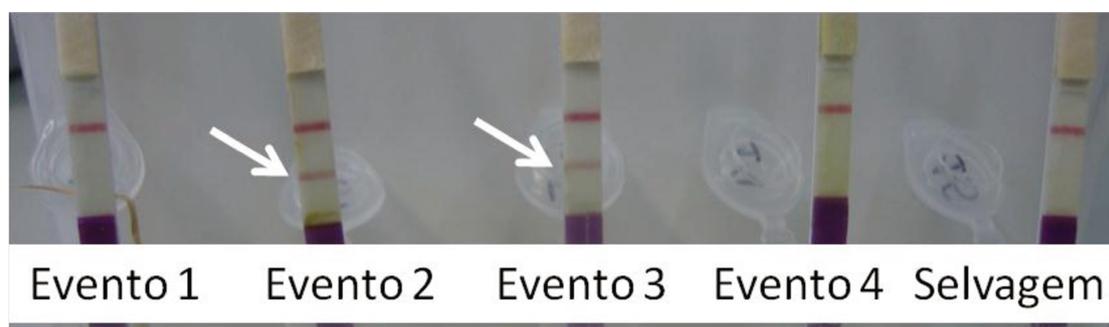


Figura 6 – Detecção da proteína PAT em plantas transgênicas de cana-de-açúcar. A presença da proteína PAT foi validada nos eventos 2 e 3, através da observação da segunda marca rosa nas fitas, indicada pelas setas.

Detecção do gene *bar* por PCR

Dentre os eventos que apresentaram resposta positiva para resistência ao Finale®, a presença do gene *bar* foi confirmada por PCR em 10 eventos obtidos por bombardeamento e 1 obtido por agrotransformação (Tabela 1).

Análise da expressão do gene alvo por PCR em tempo real

O aumento no número de transcritos do gene alvo, nos eventos em que a transgenia foi verificada por PCR pela amplificação do gene *bar* foi confirmada em todos os eventos analisados (Figura 7, Tabela 1). Uma vez que o gene alvo possui expressão endógena em cana, a expressão relativa dos eventos foi calculada utilizando os valores obtidos para as plantas não transformadas como referência. O evento 11.1 é o que apresenta menor valor de expressão relativa do gene alvo e mesmo assim o gene é 30 vezes mais expresso na planta transgênica do que nas selvagens. Por outro lado, no evento 9.5 a expressão do gene alvo é 204 vezes maior do que nas plantas não transformadas.

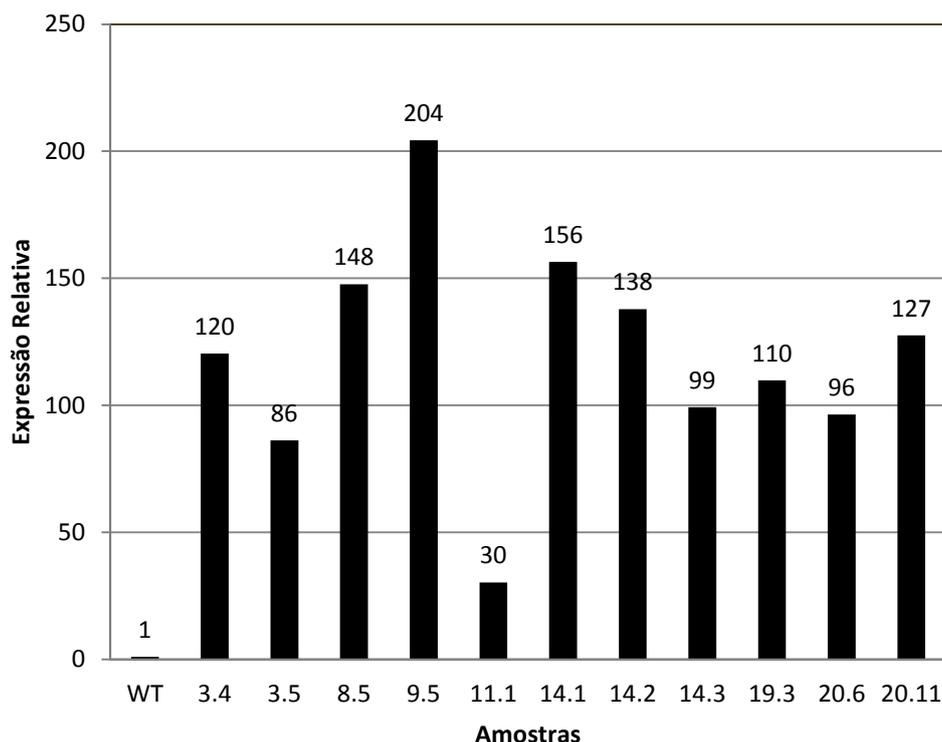


Figura 7 – Análise da expressão do gene alvo em plantas transgênicas de cana-de-açúcar por PCR em tempo real. As barras representam a expressão relativa do gene alvo em cada evento usando como referência os valores obtidos para um conjunto de 10 plantas selvagens (WT).

Análise de tolerância a estresse oxidativo

Discos foliares dos 11 eventos transgênicos foram submetidos a tratamento com H₂O₂, que se mostrou eficaz na discriminação de eventos de cana mais tolerantes. De modo geral, quanto maior a concentração de H₂O₂, maior degradação de clorofila foi observada. Em todas as concentrações utilizadas foi observado pelo menos um evento mais tolerante ao H₂O₂ que as plantas selvagens (Figura 8). No entanto, foi no tratamento realizado com a maior concentração de H₂O₂ (1 M) que se observou o maior número de eventos estatisticamente mais tolerantes que as plantas selvagens (sete dos onze eventos avaliados, Figura 8).

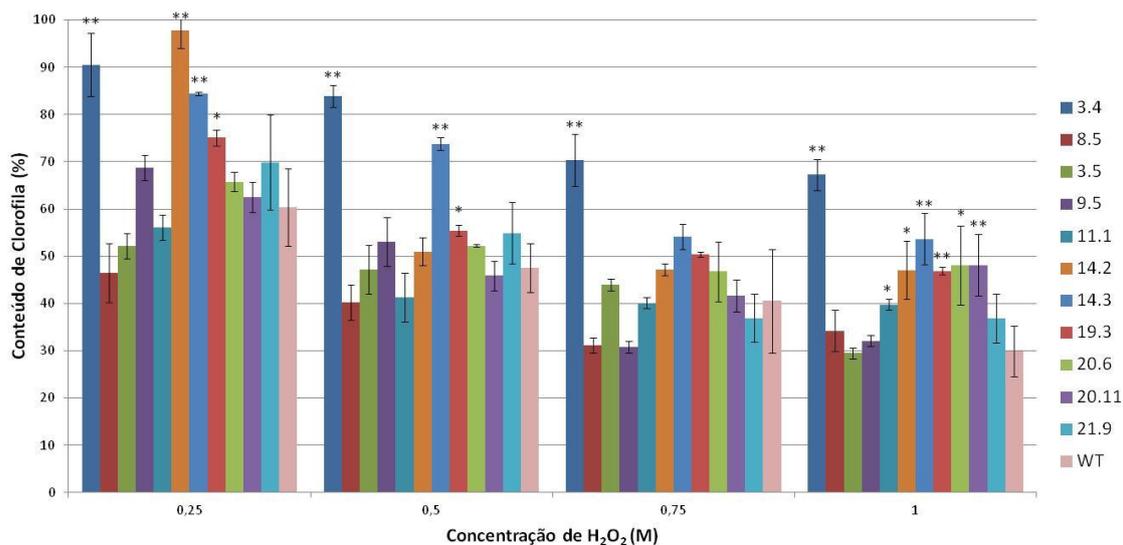


Figura 8 – Avaliação da tolerância de plantas transgênicas de cana-de-açúcar ao estresse oxidativo. O conteúdo de clorofila total em discos foliares de plantas transgênicas e selvagens de cana-de-açúcar foi avaliado após tratamento com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O tratamento com 1 M de H₂O₂ mostrou que sete eventos transgênicos possuem menor degradação da clorofila que as plantas selvagens (WT). *P<0,05 e **P<0,01.

Discussão

Para promover tolerância celular a estresses abióticos, as respostas iniciais ao estresse em plantas são a acumulação de íons e alterações no potencial hídrico celular, seguida da ativação ou repressão de genes a fim de aumentar a proteção contra a perda de água por transpiração ou mesmo melhorar a captação de água pelas raízes (Bray, 1993). A capacidade de uma planta tolerar a seca está intimamente ligada aos mecanismos de adaptação aos estresses presentes em seu genoma e em como esses mecanismos são efetivamente ativados (Kantar et al., 2011). O estresse hídrico também influencia processos bioquímicos e fisiológicos como fotossíntese, tamanho das células foliares, transpiração, taxa de crescimento e fechamento estomático (Reddy et al., 2004).

Ergen e Budak (2009) observaram 2400 genes diferencialmente expressos em seis bibliotecas subtrativas de genótipos de trigo susceptíveis ou tolerantes a seca submetidos a sete dias de estresse hídrico, evidenciando que a resposta gênica a seca é complexa, envolve muitas vias de sinalização e, por isso, merece especial atenção. O gene alvo que foi utilizado nesse trabalho é induzido por seca conforme demonstrado por Rocha et al. (2007), que analisaram o transcriptoma de cana-de-açúcar de um cultivar de cana sensível à seca sob condições de estresse hídrico, identificando 93 genes diferencialmente expressos.

Usualmente, genes envolvidos com o acúmulo de prolina são ativados por estresse hídrico (Greene, 2002). Esse aminoácido é um agente antioxidante, que atua como osmoprotetor na adaptação das plantas aos estresses ambientais, como a seca (Molinari et al., 2004). Sendo assim, avaliar a resposta de plantas transgênicas ao estresse oxidativo é uma maneira rápida de mensurar o potencial biotecnológico de genes modulados por seca.

Plantas de cana-de-açúcar que superexpressam o gene alvo apresentam maior tolerância a estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio, o que indica que o gene em questão contribui para reduzir os efeitos nocivos deste tipo de estresse. Talvez o gene alvo esteja envolvido com o aumento na síntese ou acúmulo de prolina, na estabilização de estruturas subcelulares, na eliminação de radicais livres ou em outras vias que estejam ligadas aos efeitos do estresse sobre as células vegetais. Outros estudos serão necessários para compreender os processos nos quais atua o gene alvo, de forma a estabelecer uma função molecular.

O aumento de tolerância ao estresse oxidativo observado nas plantas transgênicas geradas nesse trabalho indica que genes apontados como

diferencialmente expressos em trabalhos que avaliam a expressão gênica em larga escala possuem um alto potencial biotecnológico, abrindo perspectivas para a obtenção de novos cultivares mais tolerantes a estresses abióticos.

Na fase atual deste trabalho não foi possível avaliar a resposta das plantas transgênicas a outros estresses, como a suspensão de rega ou salinidade, devido à necessidade de multiplicação dos eventos gerados. Este processo já está em andamento e as plantas obtidas deverão ser submetidas a experimentos complementares com a avaliação de parâmetros fisiológicos como fotossíntese, transpiração e condutância estomática .

Embora nossos dados sejam ainda preliminares e o gene estudado possuir função desconhecida, demonstramos que este gene pode estar envolvido na resposta a estresses abióticos e que a sua superexpressão reduziu os efeitos do estresse oxidativo em folhas. Além disso, esse trabalho mostra a relevância do estudo de genes que codificam proteínas desconhecidas na identificação de genes com potencial biotecnológico.

Conclusões preliminares

Com base nos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que o protocolo utilizado para transformação de cana-de-açúcar a partir de calos embriogênicos é eficiente e foi capaz de gerar eventos transgênicos.

Além disso, os dados obtidos nesse trabalho indicam que o gene alvo está envolvido na resposta ao estresse oxidativo em cana-de-açúcar. Esses dados ainda reforçam a idéia de que genes modulados por estresses abióticos tem alto potencial biotecnológico.

4

O uso de *Brachypodium distachyon* como modelo para estudos em cana-de-açúcar

César Bueno de Souza, Andréa Akemi Hoshino, David Garvin e Marcelo Menossi
Teixeira

Introdução

O uso de plantas modelo é amplamente difundido e seu uso tem sido importante nos estudos da biologia vegetal permitindo um aumento no conhecimento da resposta a estresses bióticos e abióticos. Além de estudos da biologia básica vegetal, mais especificamente no campo da biotecnologia, as plantas modelos desempenham um papel especial. O melhoramento genético tradicional tem sido empregado por décadas no aperfeiçoamento de importantes características que afetam a produtividade e qualidade dos cultivos. Paralelamente ao melhoramento

clássico, a biotecnologia tem sido empregada na obtenção de novos cultivares através de transformação genética. Nesse contexto, as plantas modelo são de grande importância, pois são utilizadas em uma avaliação prévia da capacidade de um transgene gerar melhorias de interesse agrônômico nas plantas transformadas. Uma vez que um gene confere, por exemplo, maior tolerância a estresses abióticos em plantas modelos a probabilidade de se obter resultados semelhantes em culturas alvo é grande.

Arabidopsis thaliana e *Nicotiana tabaccum* são, de longe, as plantas modelo mais utilizadas em biotecnologia por apresentarem características de interesse biotecnológico: tamanho reduzido, crescimento rápido, produção de grandes quantidades de sementes, auto-fecundação, genoma diplóide e simples protocolos de transformação disponíveis. Entretanto, como plantas dicotiledôneas, tabaco e *Arabidopsis* não compartilham algumas características importantes com gramíneas. Sendo assim, o arroz poderia ser uma alternativa para a biotecnologia de plantas monocotiledôneas, não fosse o fato de não possuir baixa estatura, rápido ciclo biológico e fácil transformabilidade como vistos em *Arabidopsis* e tabaco. Dada a necessidade do uso de um modelo para biotecnologia de gramíneas, Garvin (2007) propôs o uso de *Brachypodium distachyon* (*Brachypodium*).

Brachypodium é uma gramínea temperada e que possui importantes características morfológicas, genômicas e requisitos de crescimento simples (Garvin, 2007; Bevan et al., 2010), além de possuir todas as principais características encontradas nas atuais plantas modelo: auto-fecundação obrigatória, baixa estatura, ciclo de vida curto e genoma pequeno. A linhagem Bd21 teve seu genoma completamente sequenciado (Vogel et al., 2010) e protocolos com alta eficiência de

transformação foram estabelecidos e publicados (Vogel et al., 2006; Vain et al., 2008; Alves et al., 2009).

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o uso de *Brachypodium* como modelo para cana-de-açúcar e o potencial biotecnológico de três genes de cana que são modulados por seca em plantas transgênicas de *Brachypodium*, linhagem Bd21.

Material e métodos

Por questões de Propriedade Intelectual, os nomes dos “clusters” utilizados nesse trabalho bem como as sequências de nucleotídeos, aminoácidos e “primers” foram omitidos.

Obtenção e confirmação do gene candidato

Três genes alvo candidatos foram selecionados a partir do trabalho publicado por Rocha et al. (2007). Os plasmídeos contendo suas sequências foram solicitados ao “Brazilian Clone Collection Center” (BCC Center). Alíquotas das bactérias contendo os clones solicitados foram estriadas em placas de Petri contendo meio LB com ampicilina 50 µg/mL e incubadas à 37°C pelo período de 16 horas. Uma colônia isolada de cada cultura foi inoculada em 5 mL de meio de cultura LB líquido e incubada à 37°C por 16 horas sob agitação de 250 r.p.m. Alíquotas de 850 µL das culturas bacterianas foram separadas e acrescidas de 150 µL de glicerol 50% (w/v) e armazenadas a -80°C para estoque permanente. O restante das suspensões bacterianas foram utilizadas para minipreparação de DNA plasmidial por lise alcalina utilizando o “QIAprep Spin

Miniprep Kit” (Qiagen®), segundo orientações do fabricante. O plasmídeos extraídos foram confirmados por digestão com as enzimas *EcoRI* e *BamHI* (Fermentas®).

Construção do vetor de expressão

As regiões codificantes dos genes foram amplificadas por PCR através do uso de “primers” desenhados nas regiões 5’ e 3’ com adição dos sítios de *BamHI* e *MluI* para posterior clonagem direcional. As reações de PCR utilizaram a enzima “Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity” (Life Technologies®). Os produtos correspondentes aos tamanhos esperados foram extraídos do gel de agarose 1%, purificados com o Kit GeneJET™ (Fermentas®) e clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega®).

Os insertos alvo candidatos foram retirados do vetor pGEM-T Easy (Promega®) com as enzimas *BamHI* e *MluI* (Fermentas®) e extraídos do gel de agarose 1%, purificados com o Kit GeneJET™ (Fermentas®). O vetor pUBILN (Camargo, 2007), correspondente ao vetor pAHC17 (Christensen and Quail, 1996) modificado, foi digerido com as mesmas enzimas para receber o inserto. O produto da digestão foi separado em gel de agarose 1% e o fragmento correspondente ao vetor foi extraído e purificado com o Kit GeneJET™ (Fermentas®). Os fragmentos contendo os genes alvo e o vetor pUBILN foram então ligados pela ação da enzima T4 DNA ligase (Fermentas®), à 22°C, por 16 horas. Estes vetores intermediários foram denominados pUBILN::ALVO1, 2 ou 3 (onde escreve-se ALVO, entenda-se o nome de cada um dos três diferentes genes utilizados).

O vetor pOL001 (Vogel et al., 2006) bem como os vetores intermediários foram digeridos com a enzima *HindIII*. Os produtos das digestões foram recuperados do gel de agarose 1%, purificados com o Kit GeneJET™ e foram, posteriormente, ligados pela

enzima T4 DNA ligase (Fermentas®). Nesse momento, os vetores finais foram denominados de pOL001:ALVO1, 2 ou 3.

Transformação genética de *Brachypodium*

Os experimentos de agrotransformação de *Brachypodium* foram realizados no laboratório do Prof. David Garvin na Universidade de Minnesota (EUA), utilizando calos embriogênicos e a cepa de *Agrobacterium* AGL1 transformada com os vetores pOL001:ALVO1, 2 e 3, conforme descrito por Alves et al. (2009). O vetor pOL001 original que possui o gene *uidA* (GUS) foi utilizado como controle positivo das transformações.

Detecção da proteína β -glucoronidase em calos e plantas transgênicas.

Após a transformação dos calos embriogênicos, parte destes foi submetida a teste histoquímico de GUS. Calos foram incubados à 37°C, por 16 horas em tampão de GUS (Na₂HPO₄ 0,1 M, EDTA 10 mM pH 8, Triton X100 0,1% e X-gluc 2 mM). O teste de GUS em calos foi realizado apenas com aqueles que eram provenientes da transformação com o plasmídeo pOL001 original (controle positivo da transformação). A outra parte desses calos foi mantida em cultura para regeneração de plantas transgênicas conforme descrito por Alves et al. (2009). As plantas regeneradas foram submetidas ao teste de GUS através do processo já descrito, utilizando-se tecido foliar.

Análise da integração dos transgenes por PCR

O DNA genômico de plantas regeneradas na presença do antibiótico higromicina e de plantas selvagens foi extraído a partir de amostras de folha. Para tal, cerca 150 mg de folha foram macerados em microtubos de centrífuga com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bastante fino. Foram acrescentados 700 µL de tampão de extração (SDS 1,25%, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 50 mM pH=8,0 e NaOH 0,03 M). As amostras foram agitadas vigorosamente e mantidas em banho-maria à 65°C, por 30 minutos sendo homogeneizadas por inversão a cada 5 minutos. Após esse período adicionaram-se 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e as amostras foram agitadas por 3 minutos.

Em seguida, os tubos foram microcentrifugados por 10 minutos, 10000 r.p.m. e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de centrífuga. Um mL etanol absoluto foi adicionado e os tubos foram invertidos por 20 vezes. Após centrifugação por 10 minutos a 10000 r.p.m. o DNA precipitado foi lavado duas vezes nos próprios tubos com etanol 70%, ressuspendido em 50 µL de água ultra pura acrescida de RNase A 100 mg/mL. Os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos e o DNA genômico foi armazenado à 4°C.

A presença do gene *hptII* no DNA genômico extraído de plantas transgênicas de cana-de-açúcar foi confirmada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) pelos “primers” direto 5´ GAATTCAGCGAGAGCCTGAC 3´ e reverso 5´ ACATTGTTGGAGCCGAAATC 3´. Utilizaram-se 2 µL de DNA, 0,75 µL dNTP (10 mM), 0,75 µL de “primer” direto (10 µM), 0,75 µL “primer” reverso (10 µM), 2,5 µL Tampão Taq 10x (suplementado com MgCl₂), 0,25 µL Taq DNA Polimerase (Life Technologies),

18 µL de água Milli-Q. Essa reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 5 minutos à 95°C, mais 35 ciclos de 30 segundos à 95°C, 45 segundos à 55°C, 30 segundos à 72°C e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. O produto dessa reação foi visualizado em gel de agarose 0,8% em TAE contendo brometo de etídeo, sob iluminação de luz ultra-violeta.

Análise da expressão dos transgenes por RT-PCR

Para avaliar a expressão dos genes alvos nas plantas transgênicas de *Brachypodium* validadas por PCR foi realizada uma análise semi-quantitativa por RT-PCR (“Reverse-Transcription”-PCR). Amostras de RNA de folhas dos eventos e de plantas selvagens foram extraídas utilizando o “Plant RNA Isolation Mini Kit” (Agilent Technologies), segundo recomendações do fabricante. A qualidade e quantidade do RNA extraído foram verificadas pelo aparelho 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies).

Alíquotas de 1,5 µg de RNA de cada evento e plantas selvagens foram tratadas com DNase I (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante, num volume final de 8 µL. Em seguida, 1 µL de cada RNA tratado foi utilizado para confirmação da digestão completa do DNA genômico pela amplificação do gene EF-1, que codifica um fator de transcrição de *Brachypodium*. As amostras que não apresentaram amplificação no RNA tratado com DNase I foram transcritas utilizando oligo d(T)₁₇VN e a enzima “SuperScript® III Reverse Transcriptase” (Life Technologies), segundo as recomendações do fabricante.

A expressão dos genes alvo foi avaliada utilizando um “primer” direto desenhado na porção final do promotor UBI-1 (5´ GCCCTGCCTTCATACGCTATT 3´) e outro reverso dentro da região codificante. Utilizaram-se 2 µL de cDNA, 0,75 µL dNTP

(10 mM), 0,75 µL de “primer” direto (10 µM), 0,75 µL “primer” reverso (10 µM), 2,5 µL Tampão Taq 10x (suplementado com MgCl₂), 0,25 µL Taq DNA Polimerase (Life Technologies), 18 µL de água Milli-Q. A reação foi submetida ao seguinte programa de amplificação: 5 minutos à 95°C, mais 35 ciclos de 30 segundos à 95°C, 45 segundos à 55°C, 30 segundos à 72°C e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. O produto dessa reação foi visualizado em gel de agarose 0,8% em TAE contendo brometo de etídeo, sob iluminação de luz ultravioleta.

Resultados

Escolha dos genes alvo e construção do vetor de expressão

Os genes alvo candidatos selecionados a partir do trabalho publicado por (Rocha et al., 2007), correspondem a três “clusters” do SUCEST. Os plasmídeos contendo os genes alvo candidatos foram obtidos junto ao BCC Center, validados por digestão enzimática e utilizados na construção dos vetores de expressão para cana. Os vetores finais pOL001::ALVO1, 2 ou 3 (Figura 1) foram validados por digestão enzimática e sequenciamento.

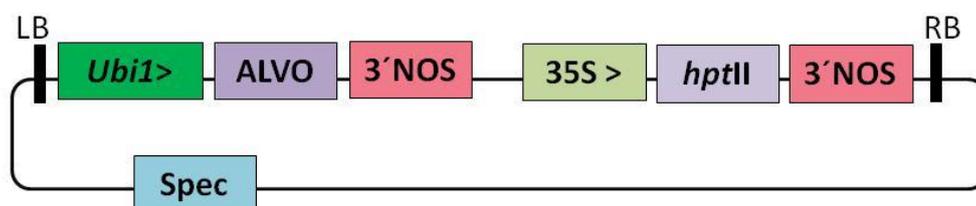


Figura 1 – Esquema teórico dos vetores utilizados nas transformações genéticas de *Brachypodium*. Os genes alvo foram clonados sob controle do promotor *Ubi1* de milho e terminador 3' NOS. O cassete de seleção possui o gene *hptII*, que confere resistência ao antibiótico higromicina, sob controle do promotor CamV35S e do terminador 3' NOS. Os plasmídeos possuem também resistência ao antibiótico espectinomicina (Spec) para seleção em bactéria.

Transformação genética de *Brachypodium*

A obtenção de calos embriogênicos a partir embriões imaturos de *Brachypodium* foi muito eficiente, gerando calos bem amarelos e consistentes. Cerca de 100 calos por construção foram infectados com a cepa AGL1 de agrobactéria transformada com os plasmídeos pOL001::ALVO1 a 3. Todos os passos para a obtenção de plantas transgênicas de *Brachypodium* (Figura 2) foram realizados como descrito no protocolo publicado por Alves et al. (2009).

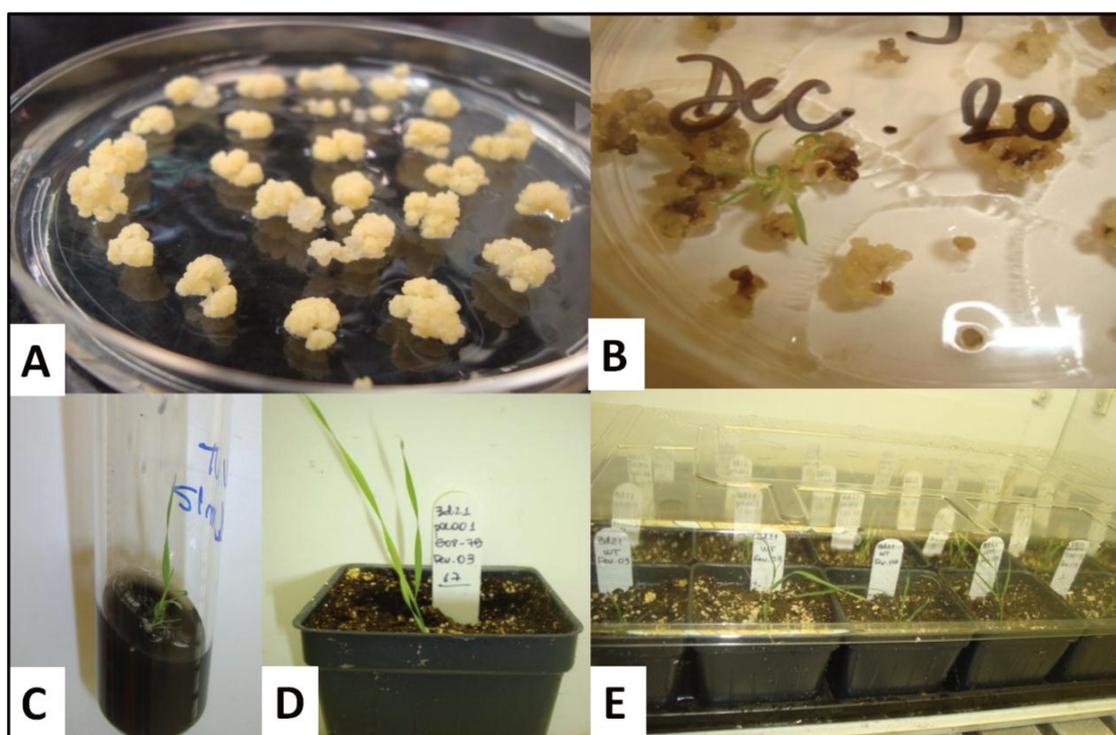


Figura 2 – Fases da transformação genética de *Brachypodium*. Calos de *Brachypodium* gerados a partir de embriões imaturos prontos para a transformação (A), regeneração e seleção de plantas (B), planta regenerada em meio de enraizamento e alongamento (C), possível planta transgênica transferida para substrato (D), possíveis plantas transgênicas sendo aclimatadas após transferência para substrato (E).

Após a regeneração de plantas na presença do agente seletivo higromicina B, foram geradas 10, 38, 26 e 42 plantas para as construções pOL001 original, pOL001::ALVO1, pOL001::ALVO2 e pOL001::ALVO3, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Números obtidos nos experimentos de transformação de *Brachypodium*. A eficiência de transformação foi calculada pela razão entre o número de plantas PCR + e o número de calos transformados, enquanto a eficiência de seleção foi calculada pela razão entre plantas PCR + e plantas regeneradas.

	pOL001::Alvo1	pOL001::Alvo2	pOL001::Alvo3
Calos Transformados	100	100	100
Plantas Regeneradas	38	26	42
PCR +	11	11	8
RT-PCR +	11	9	8
Eficiência de Transformação (%)*	11	11	8
Eficiência de Seleção (%)*	28,94	38,61	19,04

* A eficiência de transformação foi calculada pela razão entre o número de eventos confirmados por PCR e o número de calos transformados. A eficiência de seleção foi calculada pela razão entre a quantidade de plantas confirmadas por PCR e o número de plantas regeneradas.

Ensaio histoquímico de GUS

A detecção da proteína β -glucuronidase em calos de *Brachypodium* foi eficiente nos três experimentos de transformação realizados (Figura 3A). Dentre as 10 plantas regeneradas a partir da transformação com o vetor pOL001, 5 apresentaram a coloração azul indicando a expressão da proteína β -glucuronidase (Figura 3B).

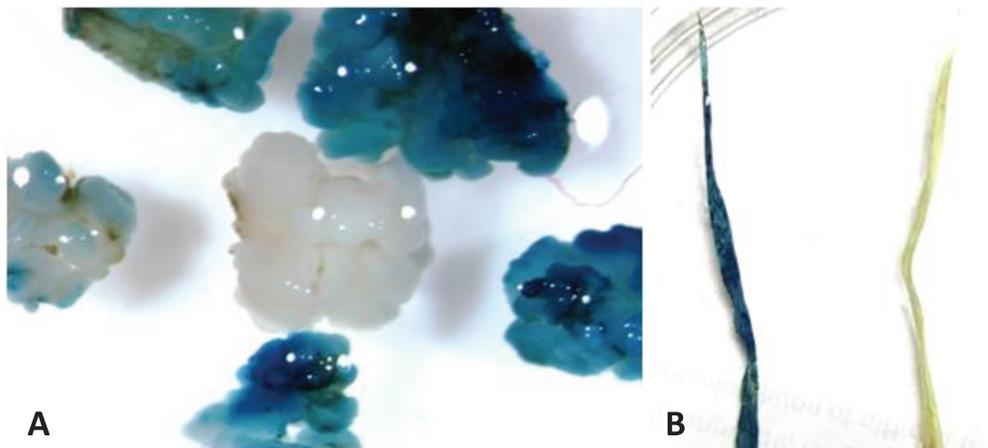


Figura 3 – Detecção de GUS em calos e folhas de *Brachypodium*. Visualização do precipitado azul em calos de *Brachypodium* transformados (A). Coloração azul em folha de *Brachypodium* transformada: à esquerda folha transformada à direita folha selvagem (B).

Detecção do gene *hptII* por PCR

Dentre os eventos que foram regenerados na presença do antibiótico higromicina, a amplificação do gene *hptII* foi confirmada em 11, 11 e 8 plantas para as construções pOL001::ALVO1, pOL001::ALVO2 e pOL001::ALVO3, respectivamente (Tabela 1).

Análise da expressão dos genes alvo por RT-PCR

Entre as plantas que apresentaram amplificação para o gene *hptII*, em apenas um único evento para a construção pOL001::ALVO2 a transcrição do gene alvo não foi observada (Tabela 1). Nos demais casos a transcrição do gene de cana-de-açúcar de cada construção foi comprovada por RT-PCR (Figura 4).

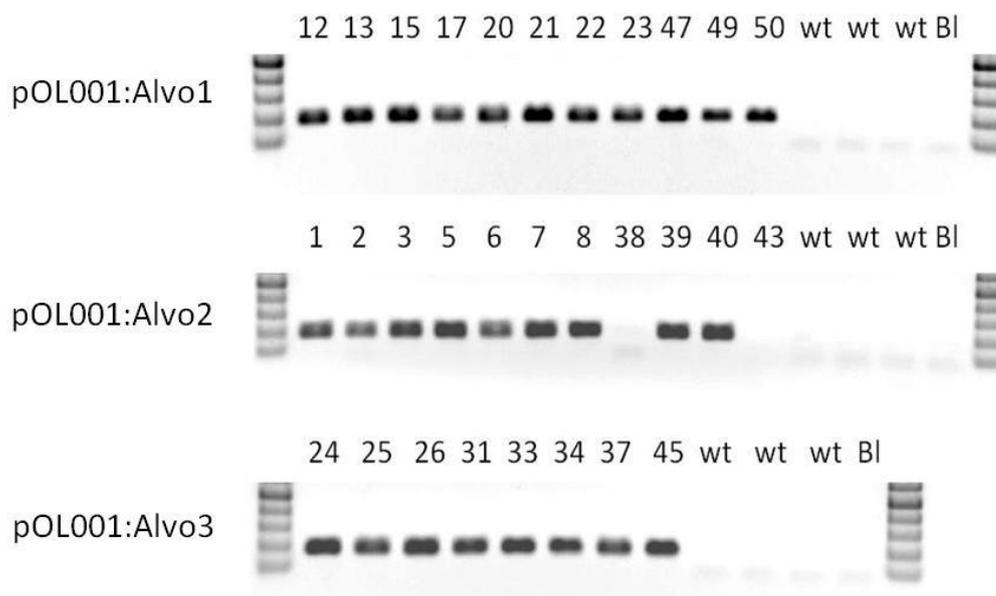


Figura 4 – Detecção de transcritos dos genes alvo em plantas transgênicas de *Brachypodium*. A detecção de transcritos de cada gene alvo foi detectada e é mostrada em gel de agarose 0.8%. Em apenas uma planta positiva por PCR não se detectou a presença de transcrito do gene alvo da construção pOL001::ALVO2 (38). Não foi observada amplificação em plantas selvagens (wt) e água (Bl).

Discussão

No presente trabalho foram geradas plantas transgênicas de *Brachypodium* com três diferentes genes de cana-de-açúcar que são modulados por seca. Infelizmente a importação das sementes transgênicas não foi possível em tempo da conclusão desta tese, devido ao grande número de eventos gerados e a necessidade de passarem por quarentenário assim que chegassem ao Brasil. A tramitação para a importação de sementes transgênicas está em andamento e assim que possível esses eventos serão submetidos a experimentos de estresses abióticos para que seja verificado se os genes que estão sendo estudados conferem aumento de tolerância a esses estresses.

Conclusão

Com o trabalho desenvolvido até o presente momento, pode-se concluir que o protocolo de transformação de *Brachypodium* foi muito eficiente e que a transcrição de genes de cana foi possível em plantas transgênicas de *Brachypodium*. Esses dados mostram uma perspectiva promissora para o uso de *Brachypodium* como modelo para a biotecnologia de cana-de-açúcar e outras monocotiledôneas.

Discussão Geral

O uso de microarranjos na seleção de genes candidatos para melhoria de características de interesse agrônômico tem sido largamente empregado (Maruyama et al., 2004; Fernandez et al., 2008; Fleury et al., 2010). Os genes que foram alvo desse trabalho foram descritos como induzidos por seca no trabalho de Rocha et al. (2007), no qual foi avaliado o transcriptoma de um cultivar de cana-de-açúcar sensível à seca sob condições de estresse hídrico, identificando 93 genes diferencialmente expressos. Em duas patentes solicitadas por Menossi et al. (2011, 2011) dois destes 93 genes foram avaliados em plantas transgênicas de tabaco e os autores mostraram que as plantas transgênicas são mais tolerantes a salinidade e seca. No presente trabalho foram avaliados outros 6 genes da lista gerada por Rocha et al. (2007), em plantas transgênicas, e dentre esses, três genes já apresentaram evidências de que conferem tolerância a estresses abióticos. Em conjunto, estes dados indicam que as listas de genes obtidas por microarranjos são excelentes fontes de informação para a seleção de candidatos para a biotecnologia.

Um polinucleotídeo que possui alta similaridade com uma ATP sintase de cana foi capaz de aumentar a tolerância à seca e à salinidade em plantas transgênicas de tabaco. As ATP sintases são importantes enzimas que fornecem energia para as células e foram muito conservadas durante a evolução. Na maioria dos sistemas as ATP sintases são localizadas nas membranas e catalisam a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato direcionado pelo fluxo de prótons entre a membrana e gerados pela transferência de elétrons. O fluxo parte do lado fotoquímico positivo (alto potencial eletroquímico) para o lado fotoquímico negativo. A reação catalisada pela ATP sintase

é completamente reversível (Mccarty, 1992). Zhang et al. (2008) mostraram que a superexpressão de uma outra subunidade de ATP sintase aumenta a tolerância a diversos estresses abióticos. A sugestão é que plantas transgênicas que superexpressam uma ou mais subunidades de ATP sintase sejam mais eficientes na produção de ATP o que pode levar a um aumento de tolerância a estresses abióticos.

O gene que codifica uma proteína com similaridade a ISP ("iron sulfur protein"), componente do complexo formador do citocromo b6f também foi capaz de aumentar a tolerância de plantas transgênicas de tabaco aos estresses hídrico e salino. O complexo citocromo b6f é encontrado nas membranas dos tilacóides de plantas, cianobactérias e algas verdes (Greer and Golden, 1992). A subunidade Rieske ISP, que foi superexpressa em plantas de tabaco, é uma das maiores encontradas no complexo citocromo b6f e está envolvida na respiração e na transferência de elétrons na fotossíntese

Na fotossíntese, o complexo citocromo b6f está envolvido na transferência de elétrons entre os dois centros de reações fotossintéticas, a partir do fotossistema II para o fotossistema I. A atuação desse complexo ocorre durante a transferência de prótons do estroma do cloroplasto através da membrana do tilacóide. O transporte de elétrons via citocromo b6f é responsável por criar um gradiente de prótons que direciona a síntese de ATP nos cloroplastos (Kurisu et al., 2003). Nesse trabalho a superexpressão com complexo Rieske ISP levou a um aumento claro na tolerância a estresses abióticos. Os dados de desempenho fotossintético mostram que as plantas transgênicas são capazes de manter a fotossíntese mais elevada do que as plantas selvagens o que pode explicar o aumento de tolerância aos estresses salino e hídrico observados nos eventos transgênicos.

O gene de cana denominado alvo neste trabalho, com função desconhecida e que é induzido por seca, foi superexpresso em cana-de-açúcar e os resultados preliminares mostram que esse gene aumenta a tolerância ao estresse oxidativo. Infelizmente não é possível atribuir uma função clara ao gene, mas as evidências indicam que ele está envolvido na resposta a estresses ambientais.

Com relação ao uso de *Brachypodium* como planta modelo para estudos biotecnológicos de gramíneas, os resultados obtidos mostram que essa planta parece ser uma excelente estratégia a ser utilizada. Embora as respostas aos estresses das plantas transgênicas não tenham sido avaliadas, o acúmulo de transcritos dos três genes alvo foi comprovado por RT-PCR em praticamente todos os eventos transgênicos e altas eficiências de seleção e transformação foram obtidas.

Conclusões Gerais

O principal objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta a estresses abióticos em plantas transgênicas que superexpressam genes de cana-de-açúcar induzidos por seca.

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. Genes modulados por estresse abiótico são excelentes candidatos para melhorias de características de interesse agrônomo através da biotecnologia.
2. A superexpressão de um polinucleotídeo com similaridade a uma subunidade de ATP sintase de cana confere tolerância aos estresses hídrico e salino em plantas transgênicas de tabaco.
3. A superexpressão de um gene que codifica uma subunidade do complexo citocromo b6f de cana confere tolerância aos estresses hídrico e salino em plantas transgênicas de tabaco.
4. A superexpressão do gene alvo parece conferir tolerância ao estresse oxidativo em plantas transgênicas de cana-de-açúcar.
5. O fato do gene alvo possuir função desconhecida assim como 5% dos transcritos identificados pelo projeto SUCEST, os estudos envolvendo esses genes são importantes devido a alta possibilidade de patenteamento.
6. O uso de *Brachypodium* como modelo para cana-de-açúcar é muito promissor devido à facilidade e alta eficiência de transformação observadas. Além disso, essa planta possui auto-fecundação obrigatória, baixa estatura, ciclo biológico curto, linhagens diplóides e sequenciamento completo disponíveis, características importantes para plantas modelo.

Referências bibliográficas

- Agarwal P, Agarwal PK, Joshi AJ, Sopory SK, Reddy MK** (2010) Overexpression of PgDREB2A transcription factor enhances abiotic stress tolerance and activates downstream stress-responsive genes. *Molecular Biology Reports* **37**: 1125-1135
- Agarwal PK, Agarwal P, Jain P, Jha B, Reddy MK, Sopory SK** (2008) Constitutive overexpression of a stress-inducible small GTP-binding protein PgRab7 from *Pennisetum glaucum* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Reports* **27**: 105-115
- Ahn C, Park U, Park PB** (2011) Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **415**: 669-674
- Alves SC, Worland B, Thole V, Snape JW, Bevan MW, Vain P** (2009) A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Nature Protocols* **4**: 638-649
- Arencibia AD, Carmona ER, Tellez P, Chan MT, Yu SM, Trujillo LE, Oramas P** (1998) An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research* **7**: 213-222
- Arnon DI** (1949) Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts - Polyphenoloxidase in *Beta-Vulgaris*. *Plant Physiology* **24**: 1-15
- Arvinth S, Arun S, Selvakesavan RK, Srikanth J, Mukunthan N, Kumar PA, Premachandran MN, Subramonian N** (2010) Genetic transformation and pyramiding of aprotinin-expressing sugarcane with cry1Ab for shoot borer (*Chilo infuscatellus*) resistance. *Plant Cell Reports* **29**: 383-395
- Basnayake SWV, Moyle R, Birch RG** (2011) Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. *Plant Cell Reports* **30**: 439-448
- Begcy K, Mariano ED, Mattiello L, Nunes AV, Mazzafera P, Maia IG, Menossi M** (2011) An *Arabidopsis* Mitochondrial Uncoupling Protein Confers Tolerance to Drought and Salt Stress in Transgenic Tobacco Plants. *Plos One* **6**
- Bevan MW, Garvin DF, Vogel JP** (2010) *Brachypodium distachyon* genomics for sustainable food and fuel production. *Current Opinion in Biotechnology* **21**: 211-217
- Bhatnagar-Mathur P, Vadez V, Sharma KK** (2008) Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Reports* **27**: 411-424
- Biddington NL** (1986) The Effects of Mechanically-Induced Stress in Plants - a Review. *Plant Growth Regulation* **4**: 103-123
- Bower R, Elliott AR, Potier BAM, Birch RG** (1996) High-efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers. *Molecular Breeding* **2**: 239-249
- Boyer JS** (1982) Plant Productivity and Environment. *Science* **218**: 443-448
- Brandalise M, Maia IG, Borecky J, Vercesi AE, Arruda P** (2003) Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **35**: 203-209
- Brasileiro ACM, Carneiro VTC** (1998) Manual de Transformação Genética de Plantas. Embrapa, Brasília
- Bray EA** (1993) Molecular Responses to Water-Deficit. *Plant Physiology* **103**: 1035-1040
- Bull T** (2000) The sugarcane plant. *In* Manual of cane growing. Bureau of Sugar Experimental Stations, pp 71-83
- Camargo SR** (2007) Identificação de genes e uso de promotores modulados por etanol em cana-de-açúcar. Unicamp, Campinas

- Cameron KD, Teece MA, Smart LB** (2006) Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant Physiology* **140**: 176-183
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS** (2003) Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* **30**: 239-264
- Chen N, Xu YY, Wang X, Du C, Du JZ, Yuan M, Xu ZH, Chong K** (2011) OsRAN2, essential for mitosis, enhances cold tolerance in rice by promoting export of intranuclear tubulin and maintaining cell division under cold stress. *Plant Cell and Environment* **34**: 52-64
- Cherian S, Reddy MP, Ferreira RB** (2006) Transgenic plants with improved dehydration-stress tolerance: progress and future prospects. *Biologia Plantarum* **50**: 481-495
- Christensen AH, Quail PH** (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* **5**: 213-218
- Conab** (2011) Acompanhamento da safra brasileira. Cana-de-açúcar. Safra 2011/2012. Terceiro levantamento Dezembro/2011, Brasília. *In*, Vol 2012
- Cuming AC, Cho SH, Kamisugi Y, Graham H, Quatrano RS** (2007) Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and osmotic, salt, and drought stress in the moss, *Physcomitrella patens*. *New Phytologist* **176**: 275-287
- Daniels J, Roach BT** (1987) Taxonomy and evolution in sugarcane. *In* Sugarcane improvement through breeding. Elsevier Press, Amsterdam, pp 7- 8
- De Souza AP, Gaspar M, Da Silva EA, Ulian EC, Waclawovsky AJ, Nishiyama MY, Dos Santos RV, Teixeira MM, Souza GM, Buckeridge MS** (2008) Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant Cell and Environment* **31**: 1116-1127
- Ergen NZ, Budak H** (2009) Sequencing over 13 000 expressed sequence tags from six subtractive cDNA libraries of wild and modern wheats following slow drought stress. *Plant Cell and Environment* **32**: 220-236
- Fernandez P, Di Rienzo J, Fernandez L, Hopp HE, Paniego N, Heinz RA** (2008) Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarray analysis. *Bmc Plant Biology* **8**
- Fleury D, Jefferies S, Kuchel H, Langridge P** (2010) Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany* **61**: 3211-3222
- Franks T, Birch RG** (1991) Gene-Transfer into Intact Sugarcane Cells Using Microprojectile Bombardment. *Australian Journal of Plant Physiology* **18**: 471-480
- Gao SQ, Chen M, Xia LQ, Xiu HJ, Xu ZS, Li LC, Zhao CP, Cheng XG, Ma YZ** (2009) A cotton (*Gossypium hirsutum*) DRE-binding transcription factor gene, GhDREB, confers enhanced tolerance to drought, high salt, and freezing stresses in transgenic wheat. *Plant Cell Reports* **28**: 301-311
- Gao T, Wu YR, Zhang YY, Liu LJ, Ning YS, Wang DJ, Tong HN, Chen SY, Chu CC, Xie Q** (2011) OsSDIR1 overexpression greatly improves drought tolerance in transgenic rice. *Plant Molecular Biology* **76**: 145-156
- Garvin DF** (2007) Brachypodium: a new monocot model plant system emerges. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**: 1177-1179
- Goodwin SB, Sutter TR** (2009) Microarray analysis of Arabidopsis genome response to aluminum stress. *Biologia Plantarum* **53**: 85-99
- Greer KL, Golden SS** (1992) Conserved Relationship between Psbh and Petbd Genes - Presence of a Shared Upstream Element in Prochlorothrix-Hollandica. *Plant Molecular Biology* **19**: 355-365
- Grene R** (2002) Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *In* ASo Plant, Biologists, eds, The Arabidopsis Book,

- Habash DZ, Kehel Z, Nachit M** (2009) Genomic approaches for designing durum wheat ready for climate change with a focus on drought. *Journal of Experimental Botany* **60**: 2805-2815
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T** (1994) Efficient Transformation of Rice (*Oryza-Sativa* L) Mediated by *Agrobacterium* and Sequence-Analysis of the Boundaries of the T-DNA. *Plant Journal* **6**: 271-282
- Horsch RB, Klee HJ** (1986) Rapid Assay of Foreign Gene-Expression in Leaf-Disks Transformed by *Agrobacterium-Tumefaciens* - Role of T-DNA Borders in the Transfer Process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 4428-4432
- Huang XS, Liu JH, Chen XJ** (2010) Overexpression of PtrABF gene, a bZIP transcription factor isolated from *Poncirus trifoliata*, enhances dehydration and drought tolerance in tobacco via scavenging ROS and modulating expression of stress-responsive genes. *Bmc Plant Biology* **10**
- Huang XS, Luo T, Fu XZ, Fan QJ, Liu JH** (2011) Cloning and molecular characterization of a mitogen-activated protein kinase gene from *Poncirus trifoliata* whose ectopic expression confers dehydration/drought tolerance in transgenic tobacco. *Journal of Experimental Botany* **62**: 5191-5206
- Ignacimuthu S, Raveendar S** (2011) *Agrobacterium* mediated transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) for insect resistance. *Euphytica* **179**: 277-286
- Ingram J, Bartels D** (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 377-403
- Inman-Bamber NG, Smith DM** (2005) Water relations in sugarcane and response to water deficits. *Field Crops Research* **92**: 185-202
- Ji W, Zhu YM, Li Y, Yang LA, Zhao XW, Cai H, Bai X** (2010) Over-expression of a glutathione S-transferase gene, GsGST, from wild soybean (*Glycine soja*) enhances drought and salt tolerance in transgenic tobacco. *Biotechnology Letters* **32**: 1173-1179
- Kang SG, Choi JH, Suh SG** (2002) A leaf-specific 27 kDa protein of potato Kunitz-type proteinase inhibitor is induced in response to abscisic acid, ethylene, methyl jasmonate, and water deficit. *Molecules and Cells* **13**: 144-147
- Kantar M, Lucas SJ, Budaki H** (2011) Drought Stress: Molecular Genetics and Genomics Approaches. *Plant Responses to Drought and Salinity Stress: Developments in a Post-Genomic Era* **57**: 445-493
- Karthikeyan A, Pandian SK, Ramesh M** (2011) *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf base derived callus tissues of popular indica rice (*Oryza sativa* L. sub sp indica cv. ADT 43). *Plant Science* **181**: 258-268
- Khanna HK, Bokan M, Harrison M, Kancherela L, Dickman MB, Dale JL** (2008) Enhancing *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency of sugarcane: Progress towards an efficient, genotype-independent method. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **44**: S42-S42
- Kim HA, Utomo SD, Kwon SY, Min SR, Kim JS, Yoo HS, Choi PS** (2009) The development of herbicide-resistant maize: stable *Agrobacterium*-mediated transformation of maize using explants of type II embryogenic calli. *Plant Biotechnology Reports* **3**: 277-283
- Kishor PBK, Hong ZL, Miao GH, Hu CAA, Verma DPS** (1995) Overexpression of Delta-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants. *Plant Physiology* **108**: 1387-1394
- Kumari S, Panjabi V, Kushwaha H, Sopory S, Singla-Pareek S, Pareek A** (2009) Transcriptome map for seedling stage specific salinity stress response indicates a specific set of genes as candidate for saline tolerance in *Oryza sativa* L. *Functional & Integrative Genomics* **9**: 109-123
- Kurusu G, Zhang H, Smith JL, Cramer WA** (2003) Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* **302**: 1009-1014

- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* **25**: 402-408
- Ludwikow A, Gallois P, Sadowski J** (2004) Microarray Analysis of Ozone- and Drought-Induced Genes in Arabidopsis Thaliana. *Acta Physiologiae Plantarum* **26**: 58-58
- Luo M, Liu J, Lee D, Scully BT, Guo BZ** (2010) Monitoring the Expression of Maize Genes in Developing Kernels under Drought Stress using Oligo-microarray. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**: 1059-1074
- Manickavasagam M, Ganapathi A, Anbazhagan VR, Sudhakar B, Selvaraj N, Vasudevan A, Kasthuriengan S** (2004) Agrobacterium-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum species hybrids*) using axillary buds. *Plant Cell Reports* **23**: 134-143
- Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2004) Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant Journal* **38**: 982-993
- Maybank J, Bonsal B, Jones K, Lawford R, Obrien EG, Ripley EA, Wheaton E** (1995) Drought as a Natural Disaster. *Atmosphere-Ocean* **33**: 195-222
- Mccarty RE** (1992) A plant biochemist's view of H⁺-ATPases and ATP SYNTHASE. *Journal of Experimental Biology* **172**: 431-441
- Menossi M, Begcy K, Mariano EA, Lembke CG, Souza GM** (2011) Método para produção de plantas tolerantes a estresses ambientais, seus usos e vetor de DNA recombinante. *In* INPI, Brasil
- Menossi M, Begcy K, Mariano EA, Lembke CG, Souza GM** (2011) Vetor de DNA recombinante, método para produção de plantas tolerantes a estresses ambientais e seus usos. *In* INPI, ed, Brasil
- Ming R, Liu SC, Moore PH, Irvine JE, Paterson A** (2001) QTL Analysis in a Complex Autopolyploid: Genetic Control of Sugar Content in Sugarcane. *Genome Research* **11**: 2075-2084
- Molinari HBC, Marur CJ, Bessalho JC, Kobayashi AK, Pileggi M, Leite RP, Pereira LFP, Vieira LGE** (2004) Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Science* **167**: 1375-1381
- Molinari HBC, Marur CJ, Daros E, de Campos MKF, de Carvalho JFRP, Bessalho JC, Pereira LFP, Vieira LGE** (2007) Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum spp.*): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiologia Plantarum* **130**: 218-229
- Muller GL, Drincovich MF, Andreo CS, Lara MV** (2010) Role of photosynthesis and analysis of key enzymes involved in primary metabolism throughout the lifespan of the tobacco flower. *Journal of Experimental Botany* **61**: 3675-3688
- Nandakumar R, Abramson B, Barone P, Cheng XY, Luo S, Folkerts O, Preuss D** (2010) Evaluation and Comparison of Sugarcane Genotypes for Transient and Stable Transformation Efficiency. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **46**: S192-S193
- Ozawa K, Takaiwa F** (2010) Highly efficient Agrobacterium-mediated transformation of suspension-cultured cell clusters of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* **179**: 333-337
- Papini-Terzi FS, Rocha FR, Vencio RZN, Oliveira KC, Felix JD, Vicentini R, Rocha CD, Simoes ACQ, Ulian EC, Di Mauro SMZ, Da Silva AM, Pereira CAD, Menossi M, Souza GM** (2005) Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. *DNA Research* **12**: 27-38
- Passioura JB** (1996) Drought and drought tolerance. *Plant Growth Regulation* **20**: 79-83

- Petrillo CP, Carneiro NP, Purcino AAC, Carvalho CHS, Alves JD, Carneiro AA** (2008) Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **43**: 371-378
- Qin XQ, Zeevaart JAD** (2002) Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiology* **128**: 544-551
- Rech EL, Vainstein MH, Davey MR** (1991) An electrical particle acceleration gun for gene transfer into cells *Technique* **3**: 143-149
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M** (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* **161**: 1189-1202
- Rocha FR, Papini-Terzi FS, Nishiyama MY, Jr., Vencio RZ, Vicentini R, Duarte RD, de Rosa VE, Jr., Vinagre F, Barsalobres C, Medeiros AH, Rodrigues FA, Ulian EC, Zingaretti SM, Galbiatti JA, Almeida RS, Figueira AV, Hemerly AS, Silva-Filho MC, Menossi M, Souza GM** (2007) Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC Genomics* **8**: 71
- Rodrigues SM, Andrade MO, Gomes APS, DaMatta FM, Baracat-Pereira MC, Fontes EPB** (2006) Arabidopsis and tobacco plants ectopically expressing the soybean antiquitin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1909-1918
- Rosegrant MW, Cai XM** (2003) Water development and food production: A global perspective. *Water: Science, Policy, and Management - Challenges and Opportunities* **16**: 99-120
- Sanford JC, de VMJ, Russel JA, Allen A** (1987) Delivery of substances into cells tissues using a particle bombardment process. *Particle Science Technology* **5**: 27-37
- Schulze ED, Hall AE, Lange OL, Evenari M, Kappen L, Buschbom U** (1980) Long-Term Effects of Drought on Wild and Cultivated Plants in the Negev Desert .1. Maximal Rates of Net Photosynthesis. *Oecologia* **45**: 11-18
- Sheveleva E, Chmara W, Bohnert HJ, Jensen RG** (1997) Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiology* **115**: 1211-1219
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (1999) Molecular responses to drought stress. *In* Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants, Texas, pp 11-28
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 217-223
- Souza GM, Simoes ACQ, Oliveira KC, Garay HM, Fiorini LC, Gomes FD, Nishiyama-Junior MY, da Silva AM** (2001) The sugarcane signal transduction (SUCAST) catalogue: prospecting signal transduction in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology* **24**: 25-34
- Stachel SE, Messens E, Vanmontagu M, Zambryski P** (1985) Identification of the Signal Molecules Produced by Wounded Plant-Cells That Activate T-DNA Transfer in *Agrobacterium-Tumefaciens*. *Nature* **318**: 624-629
- Sugiharto B** (2004) Biochemical and Molecular Studies on Sucrose-phosphate Synthase and Drought Inducible-protein in Sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Journal ILMU DASAR* **5**: 62-67
- Taiz L, Zeiger E** (2004). *In* *Fisiologia vegetal*. Artmed, Porto Alegre, pp 449-484
- Tang H, Sezen U, Paterson AH** (2010) Domestication and plant genomes. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 160-166
- Tester M, Bacic A** (2005) Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiology* **137**: 791-793
- Vain P, Worland B, Thole V, McKenzie N, Opanowicz M, Fish LJ, Bevan MW, Snape JW** (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium*

- distachyon (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. *Plant Biotechnology Journal* **6**: 236-245
- Vanderlei A** (2006) Respostas a acidez em células de tabaco (*Nicotiana tabacum*) cv. BY-2 em diferentes estados de sensibilidade. Universidade de São Paulo
- Vega JM, Yu WC, Han FP, Kato A, Peters EM, Zhang ZJ, Birchler JA** (2008) Agrobacterium-mediated transformation of maize (*Zea mays*) with Cre-lox site specific recombination cassettes in BIBAC vectors. *Plant Molecular Biology* **66**: 587-598
- Vendruscolo ECG, Schuster I, Pileggi M, Scapim CA, Correa Molinari HB, Marur CJ, Esteves Vieira LG** (2007) Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of Plant Physiology* **164**: 1367-1376
- Vettore AL, da Silva FR, Kemper EL, Souza GM, da Silva AM, Ferro MIT, Henrique-Silva F, Giglioti EA, Lemos MVF, Coutinho LL, Nobrega MP, Carrer H, Franca SC, Bacci M, Goldman MHS, Gomes SL, Nunes LR, Camargo LEA, Siqueira WJ, Van Sluys MA, Thiemann OH, Kuramae EE, Santelli RV, Marino CL, Targon MLPN, Ferro JA, Silveira HCS, Marini DC, Lemos EGM, Monteiro-Vitorello CB, Tambor JHM, Carraro DM, Roberto PG, Martins VG, Goldman GH, de Oliveira RC, Truffi D, Colombo CA, Rossi M, de Araujo PG, Sculaccio SA, Angella A, Lima MMA, de Rosa VE, Siviero F, Coscrato VE, Machado MA, Grivet L, Di Mauro SMZ, Nobrega FG, Menck CFM, Braga MDV, Telles GP, Cara FAA, Pedrosa G, Meidanis J, Arruda P** (2003) Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Research* **13**: 2725-2735
- Vogel JP, Garvin DF, Leong OM, Hayden DM** (2006) Agrobacterium-mediated transformation and inbred line development in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **84**: 199-211
- Vogel JP, Garvin DF, Mockler TC, Schmutz J, Rokhsar D, Bevan MW, Barry K, Lucas S, Harmon-Smith M, Lail K, Tice H, Grimwood J, McKenzie N, Huo NX, Gu YQ, Lazo GR, Anderson OD, You FM, Luo MC, Dvorak J, Wright J, Febrer M, Idziak D, Hasterok R, Lindquist E, Wang M, Fox SE, Priest HD, Filichkin SA, Givan SA, Bryant DW, Chang JH, Wu HY, Wu W, Hsia AP, Schnable PS, Kalyanaraman A, Barbazuk B, Michael TP, Hazen SP, Bragg JN, Laudencia-Chingcuanco D, Weng YQ, Haberer G, Spannagl M, Mayer K, Rattei T, Mitros T, Lee SJ, Rose JKC, Mueller LA, York TL, Wicker T, Buchmann JP, Tanskanen J, Schulman AH, Gundlach H, de Oliveira AC, Maia LD, Belknap W, Jiang N, Lai JS, Zhu LC, Ma JX, Sun C, Pritham E, Salse J, Murat F, Abrouk M, Bruggmann R, Messing J, Fahlgren N, Sullivan CM, Carrington JC, Chapman EJ, May GD, Zhai JX, Ganssmann M, Gurazada SGR, German M, Meyers BC, Green PJ, Tyler L, Wu JJ, Thomson J, Chen S, Scheller HV, Harholt J, Ulvskov P, Kimbrel JA, Bartley LE, Cao PJ, Jung KH, Sharma MK, Vega-Sanchez M, Ronald P, Dardick CD, De Bodt S, Verelst W, Inze D, Heese M, Schnittger A, Yang XH, Kalluri UC, Tuskan GA, Hua ZH, Vierstra RD, Cui Y, Ouyang SH, Sun QX, Liu ZY, Yilmaz A, Grotewold E, Sibout R, Hematy K, Mouille G, Hofte H, Pelloux J, O'Connor D, Schnable J, Rowe S, Harmon F, Cass CL, Sedbrook JC, Byrne ME, Walsh S, Higgins J, Li PH, Brutnell T, Unver T, Budak H, Belcram H, Charles M, Chalhoub B, Baxter I, Initiative IB** (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* **463**: 763-768
- Wang BQ, Zhang QF, Liu JH, Li GH** (2011) Overexpression of PtADC confers enhanced dehydration and drought tolerance in transgenic tobacco and tomato: Effect on ROS elimination. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **413**: 10-16
- Wang DX, Zhao Q, Zhu DY, Ao GM, Yu JJ** (2006) Particle-bombardment-mediated cotransformation of maize with a lysine rich protein gene (sb401) from potato. *Euphytica* **150**: 75-85
- Wei HR, Wang ML, Moore PH, Albert HH** (2003) Comparative expression analysis of two sugarcane polyubiquitin promoters and flanking sequences in transgenic plants. *Journal of Plant Physiology* **160**: 1241-1251

- Wu XL, Shiroto Y, Kishitani S, Ito Y, Toriyama K** (2009) Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. *Plant Cell Reports* **28**: 21-30
- Xiong LM, Ishitani M, Zhu JK** (1999) Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in arabidopsis. *Plant Physiology* **119**: 205-211
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2005) Gene regulatory network in drought and cold stress responses. *Plant and Cell Physiology* **46**: S9-S9
- Yao Q, Cong L, Chang JL, Li KX, Yang GX, He GY** (2006) Low copy number gene transfer and stable expression in a commercial wheat cultivar via particle bombardment. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3737-3746
- Zhang GY, Chen M, Li LC, Xu ZS, Chen XP, Guo JM, Ma YZ** (2009) Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3781-3796
- Zhang XX, Liu SK, Takano T** (2008) Overexpression of a mitochondrial ATP synthase small subunit gene (AtMtATP6) confers tolerance to several abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnology Letters* **30**: 1289-1294
- Zhangsun D, Luo S, Chen R, Tang K** (2007) Improved *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of GNA transgenic sugarcane. *Biologia* **62**: 386-393
- Zhu JK** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 247-273
- Zhu YJ, McCafferty H, Osterman G, Lim S, Agbayani R, Lehrer A, Schenck S, Komor E** (2011) Genetic transformation with untranslatable coat protein gene of sugarcane yellow leaf virus reduces virus titers in sugarcane. *Transgenic Research* **20**: 503-512
- Zuraida AR, Rahiniza K, Hafiza MRN, Roowi S, Zamri Z, Subramaniam S** (2010) Factors affecting delivery and transient expression of gusA gene in Malaysian indica rice MR 219 callus via biolistic gun system. *African Journal of Biotechnology* **9**: 8810-8818