



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

(21) **PI0705917-5 A2**

(22) Data de Depósito: 11/12/2007

(43) Data da Publicação: 18/08/2009
(RPI 2015)



* B R P I 0 7 0 5 9 1 7 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*

C07H 21/04 (2009.01)

C12N 15/82 (2009.01)

C12N 15/29 (2009.01)

C12N 15/10 (2009.01)

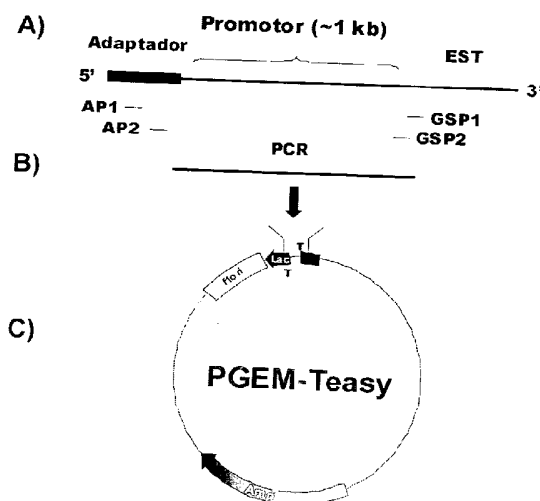
A01H 5/00 (2009.01)

(54) Título: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA DIRECIONAR A EXPRESSÃO DE GENES USANDO O PROMOTOR DO GENE DA FAMÍLIA DAS ISOFLAVONAS DE PLANTAS DE CAFÉ**

(73) Titular(es): Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Instituto Agrônomo de Campinas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP

(72) Inventor(es): IVAN DE GODOY MAIA, MARCOS BRANDALISE, MIRIAN PEREZ MALUF, OLIVEIRO GUERREIRO FILHO

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA DIRECIONAR A EXPRESSÃO DE GENES USANDO O PROMOTOR DO GENE DA FAMÍLIA DAS ISOFLAVONAS DE PLANTAS DE CAFÉ. A presente invenção compreende a descrição de uma nova sequência regulatória provida para direcionar a expressão de uma sequência de nucleotídeo, tal como genes estruturais, em folhas de plantas, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas. Mais especificamente a invenção refere-se a sequências regulatórias de polinucleotídeos isoladas de plantas de café que são capazes de inicial- e acionar a transcrição de polinucleotídeos, e ao uso destas sequências regulatórias no direcionamento de transcrição de polinucleotídeos endógenos e/ou heterólogos para tecidos foliares e produção de polipeptídeos. A invenção descreve ainda construções de DNA que contêm o promotor do gene da família das isoflavonas de plantas de café que está operacionalmente ligado a um gene heterólogo e/ou endógeno. Além disso, a invenção diz respeito ao uso destas construções na forma de vetores de expressão, vetores recombinantes e em plantas, células vegetais ou protoplastos transgênicos. A invenção ainda descreve um método utilizando tais construções contendo o promotor do gene da família das isoflavonas de plantas de café para produção de plantas, células vegetais ou protoplastos transgênicos.





COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA DIRECIONAR A EXPRESSÃO DE GENES USANDO O PROMOTOR DO GENE DA FAMÍLIA DAS ISOFLAVONAS DE PLANTAS DE CAFÉ

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção está relacionada a um novo promotor para expressão específica de genes em folhas de plantas. Mais especificamente a invenção refere-se a seqüências regulatórias de polinucleotídeos isoladas de plantas de café que são capazes de iniciar e acionar a transcrição de polinucleotídeos, e ao uso destas seqüências regulatórias na modificação da transcrição de polinucleotídeos endógenos e/ou heterólogos e produção de
10 polipeptídeos no tecido foliar. A invenção descreve ainda construções de DNA que contém o promotor de um gene que codifica uma proteína da família das isoflavonas de plantas de café que está operacionalmente ligado a um gene heterólogo e/ou endógeno. Além disso, a invenção diz respeito ao uso destas construções na forma de vetores de expressão, vetores recombinantes e em plantas, células vegetais ou protoplastos transgênicos. A invenção ainda
15 descreve um método utilizando tais construções contendo o promotor de um gene que codifica uma proteína da família das isoflavonas de plantas de café para produção de plantas, células vegetais ou protoplastos transgênicos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

20 A cafeicultura desempenha atualmente um importante papel na economia nacional gerando divisas na ordem de 2 bilhões de dólares anuais com 26 milhões de sacas exportadas ao ano (Companhia Nacional do Abastecimento – Conab). Com um mercado ainda em expansão, o agronegócio do café gera, em todo mundo, recursos na ordem de 91 bilhões de dólares ao comercializar em média 115 milhões de sacas. O Brasil ocupa uma posição dominante no mercado internacional, se destacando como maior produtor (contribuição de
25 30% da produção mundial nas últimas safras) e exportador mundial de café, com participação média de 25%. O agronegócio do café representa mais de 2,5 % do valor total das exportações brasileiras além de gerar oito milhões de empregos diretos e indiretos, destacando-se como o setor que mais emprega no Brasil. Apesar do ótimo desempenho, a expansão da produção de café no Brasil é limitada, dentre outros fatores, por pragas e

doenças que atacam a cultura. Dentre as principais doenças do café, destaca-se, afetando as folhas, o fungo *Hemileia vastatrix* causador da ferrugem do cafeeiro.

5 A crescente demanda mundial por alimentos de melhor qualidade, principalmente livres de defensivos agrícolas, tem promovido um avanço significativo em diversas áreas da produção vegetal. Dentre estas se destaca o melhoramento genético vegetal.

10 O melhoramento genético de plantas visando melhorias agronômicas vem sendo realizado pelo homem há milhares de anos utilizando-se de procedimentos clássicos baseados em cruzamentos controlados entre espécies. Entretanto, com o advento da biologia molecular nos últimos anos, somado ao desenvolvimento de técnicas biotecnológicas avançadas, o melhoramento genético de plantas via engenharia genética tornou-se uma ferramenta importante na obtenção de plantas genotipicamente superiores em um curto espaço de tempo, tornando-se de grande interesse para o setor agrícola.

15 Métodos avançados de melhoramento genético vegetal têm se destacado principalmente devido à possibilidade de obtenção de resultados uniformes e direcionados para características desejáveis. Dentre os inúmeros métodos biotecnológicos mundialmente utilizados para o melhoramento, destaca-se como um dos mais importantes, a produção de plantas geneticamente modificadas. A transgenia tem permitido o melhoramento de genótipos previamente selecionados por métodos convencionais através da introdução de um ou poucos genes que, em muitos casos, são encontrados em espécies distantes e que não

20 poderiam ser transferidos via recombinação, o que acontece obrigatoriamente entre indivíduos sexualmente compatíveis. Por outro lado, se assim fossem transferidos levar-se-ia anos para obtenção do genótipo desejado. Em se tratando de melhoramento de espécies perenes, mais precisamente da espécie *Coffea arabica*, pode-se esperar um mínimo de 25 anos entre as primeiras hibridações até a obtenção de novos cultivares.

25 O melhoramento de espécies perenes através da obtenção de plantas geneticamente modificadas tem sido apontado como uma alternativa ao melhoramento clássico. Nesse contexto, a introdução via transgenia de características desejáveis como a resistência a fatores bióticos e abióticos tende a ser facilitada, uma vez que um grande número de genes induzidos por tais fatores em diferentes espécies tem sido identificado e caracterizado.

30 Muitos destes genes têm sido identificados em projetos onde genomas inteiros foram sequenciados, como nos casos de *Arabidopsis thaliana* e do arroz, ou em projetos nos quais foram sequenciados milhares de cDNAs oriundos de bibliotecas construídas a partir de

diferentes tecidos e em diferentes condições de estresse, também conhecidos como projetos ESTs (expressed sequence tags). Como exemplo do último caso, na área vegetal, destaca-se o projeto Genoma Café.

5 Os projetos de seqüenciamento acima citados são de suma importância, entretanto sabe-se que a simples identificação de um gene não é garantia única para a sua utilização na obtenção de transgênicos. A produção eficiente de uma proteína heteróloga em uma planta depende, por exemplo, da obtenção de altos níveis de transcrição do gene introduzido e para isso promotores altamente ativos são necessários.

10 A expressão de um gene é regulada, em parte, pelos processos celulares envolvidos na transcrição. Durante a transcrição, um RNA de filamento único, complementar à seqüência de DNA a ser transcrita é formado pela ação das polimerases de RNA e dos fatores de transcrição. A iniciação da transcrição em células eucarióticas é regulada por interações complexas entre motivos de DNA *cis*-atuantes, localizados dentro do gene a ser transcrito, e fatores protéicos *trans*-atuantes. Dentre as regiões regulatórias *cis*-atuantes estão as
15 seqüências de DNA, chamadas promotores, às quais a RNA polimerase é primeiramente ligada, direta ou indiretamente. Para efeitos da presente invenção, o termo “promotor” se refere a seqüências específicas de DNA, usualmente localizadas à montante (5’) da região codificadora de um gene estrutural, e que controla a expressão da mesma devido a sua capacidade de prover um sítio de reconhecimento para a RNA polimerase e/ou outros fatores
20 necessários para o início da transcrição, e para que esta se inicie no local correto do gene.

Tipicamente, um promotor possui um “TATA box” e uma região de ativação situada à montante. Este “TATA Box” é responsável pela localização do sítio de início da transcrição, e está localizado a aproximadamente 25 pares de base do início da seqüência codificadora do gene (na direção 3’).

25 Existem dois tipos básicos de promotores, os induzíveis e os não induzíveis, também chamados constitutivos. Os promotores constitutivos são capazes de dirigir a expressão de seqüências de DNA durante todo o desenvolvimento de uma planta, além de não possuir uma especificidade quanto ao local de expressão desta seqüência, sendo esta, então, expressa em uma grande variedade de células e tecidos da planta. Apesar disso, o termo “constitutivo” não
30 implica que a seqüência é expressa nos mesmos níveis em todas as células vegetais. O promotor induzível, por sua vez é um promotor capaz de ativar (direta ou indiretamente) a transcrição de uma ou mais seqüências de DNA, ou genes, em resposta a um determinado

indutor. Na falta deste indutor, as seqüências de DNA, ou genes, não serão transcritos. O indutor pode ser um componente químico (descrito, por exemplo, no documento de patente WO9519443), um estresse de origem fisiológica (como no caso de fermentos, que é descrito, por exemplo, no documento de patente US6677505), ou um composto endógeno gerado em resposta a mudanças no desenvolvimento da planta.

Os promotores constituem, portanto, uma ferramenta chave em processos biotecnológicos a fim de garantir que a expressão de um gene de interesse seja efetiva e regulada espacial e temporalmente. Dentre os promotores usualmente empregados na produção de plantas geneticamente modificadas destacam-se o promotor 35S do Vírus do Mosaico da Couve Flor (CaMV 35S), os promotores dos genes da nopalina e octopina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* e o promotor do gene que codifica a ubiquitina de milho. Apesar dos grandes avanços obtidos com o emprego desses promotores, os padrões de expressão dos transgenes submetidos à regulação dos mesmos são variados e baixos em alguns casos, não havendo garantia de expressão no órgão/tecido adequado. O uso de promotores ubíquos como os citados, determina a expressão do produto gênico em todos os órgãos da planta, o que nem sempre é desejável. Tal característica, desnecessária e indesejável em plantas geneticamente modificadas destinadas a alimentação humana, tende a diminuir a aceitação do produto final, ou a de seus derivados, pelos consumidores resultando em resistência aos produtos geneticamente modificados. Nesse caso, promotores tecido-específicos que garantam uma regulação espacial do transgene seriam de grande importância e vários estudos estão sendo empreendidos com esse propósito.

Existem inúmeros promotores tecido-específicos descritos para plantas, como é o caso da expressão específica em semente (WO8903887), tubérculo (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keil et al., 1989 EMBO J. 8: 1323-1330), folhas (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Hudspeth et al., 1989 Plant Mol Biol 12:579-589), fruta (Edwards and Coruzzi, 1990 Annu.Rev.Genet. 24: 275-303 e US5753475), caule (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keller et al., 1988 EMBO J. 7: 3625-3633), tecidos vasculares (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Peleman et al., 1989 Gene 84: 359-369 e Schmülling et al., 1989 Plant Cell 1: 665-670), raiz (US20060143735 e como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keller et al., 1989 Genes Devel. 3:1639-1646), estames (WO8910396,

WO9213956), promotores específicos da zona de deiscência (WO9713865) e meristema (Ito et al., 1994 Plant Molecular Biology, 24: 863-878).

Outros exemplos de promotores que controlam a expressão de genes especificamente em dado tecido/órgão e que são importantes para resistência a estresses bióticos e abióticos podem ser visualizados nos documentos de patentes: WO2007044992 (promotores de café específicos para expressão de genes em sementes); WO2007005980 (promotor do gene que codifica a dehidrina de café); WO20077044751 (promotores que codificam genes envolvidos na via biosintética de ácidos clorogênicos em plantas de café); US6610840 (promotor de batata específico para mesófilo); US6800794 (promotor de alfafa induzível por estresse biótico); US7153953 (promotor de café específico de folha).

Apesar de existir um grande número de promotores específicos para diferentes tecidos vegetais, apenas o promotor do documento de patente US7153953 é específico para folhas de café. Apesar do promotor da presente invenção também ser específico para os tecidos foliares de café, ele difere da patente US7153953 por ser um promotor isolado de um gene diferente (o promotor da patente US7153953 é oriundo do gene *rbcS*, enquanto que o promotor da presente invenção pertence ao gene que codifica uma proteína da família das isoflavonas) e por apresentar especificidade diferente (enquanto o promotor da presente invenção controla a expressão em resposta a dano mecânico, o promotor do gene *rbcS* é de expressão constitutiva). Além do mais, o promotor da presente invenção não apresenta nenhuma similaridade com os promotores já descritos no estado da técnica (vide Exemplo 1). Esses fatos demonstram a necessidade de identificação e caracterização de novos promotores para plantas dicotiledôneas, especialmente àqueles específicos para tecidos foliares de plantas de café, e a importância do promotor da presente invenção para a produção de plantas geneticamente modificadas.

Um motivo de preocupação relativo ao uso de plantas geneticamente modificadas refere-se à expressão de proteínas tóxicas como as utilizadas para o controle de determinados insetos e pragas. Muitos trabalhos relatam a eficiente utilização da proteína Bt (de *Bacillus thuringiensis*) em plantas transgênicas visando o controle de insetos praga (Shu, Q.Y., Ye, G.Y., Cui, H.R., Cheng, X., Xiang, Y., Wu, D., et al. 2000. Transgenic rice plants with a synthetic cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. Molecular Breed, 6: 433-439; Leroy, T., Henry, A.M., Royer, M., Altosaar, I., Frutos, R., Duris, D., Philippe, R. 2000. Genetically modified coffee plants expressing the

Bacillus thuringiensis cryI Ac gene for resistance to leaf miner. Plant Molecular Reports, 19: 382-389; Nester, E.W., Thomashow, L.S., Matthew, M. and Gordon, M. 2002. 100 Years of *Bacillus thuringiensis*: a critical scientific assessment. American Academy of Microbiology, 1752 N Street, NW Washington, DC, 16 pp). Entretanto, tal metodologia pode fazer com que os insetos alvo adquiriram resistência quando mantidos sob constante pressão de seleção (Meng, F., Shen, J., Zhou, W., and Cen, H., 2004. Long-term selection for resistance to transgenic cotton expressing *Bacillus thuringiensis* toxin in *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera:Noctuidae). Pest Manage Sci., 60: 167-172), o que normalmente acontece quando promotores constitutivos são utilizados para expressão das proteínas de interesse. Esses efeitos indesejados poderiam ser minimizados através do uso de promotores órgão/tecido-específicos que, se possível, fossem responsivos a determinados estímulos como, por exemplo, a um determinado estresse biótico. Neste caso, a expressão do transgene seria limitada ao período de duração do estímulo e principalmente direcionada para o local onde o estímulo foi produzido, ressaltando mais uma vez a importância do promotor da presente invenção.

A obtenção de plantas geneticamente modificadas com genes de interesse agrônômico (resistência a pragas, doenças, seca, geada, etc...) isolados de espécies selvagens de *Coffea* representa um avanço significativo, pois permite acelerar drasticamente o processo de obtenção de novos cultivares. Nesse contexto, o direcionamento da expressão dos genes de interesse para determinados órgãos específicos da planta, utilizando-se de promotores tecido-específicos provenientes da própria espécie, constitui uma importante ferramenta biotecnológica. Tal inovação viabiliza não só a construção de cassetes de expressão compostos de subunidades (promotor e gene) pertencentes ao gênero *Coffea*, mas também a obtenção de um padrão de expressão tecido-específico altamente desejável tanto do ponto de vista de biossegurança como de opinião pública. A busca por promotores com tais características tem sido uma prioridade em programas biotecnológicos que objetivam a produção e liberação comercial de organismos geneticamente modificados.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção compreende a descrição de uma nova sequência regulatória provida para direcionar a expressão de uma sequência de nucleotídeo em tecidos foliares, tal como genes estruturais, em plantas, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas. De acordo

com a presente invenção é descrito um promotor tecido-específico isolado de plantas de café (*Coffea arabica*) denominado de **CalsoR** junto com um método para uso dessa região regulatória de polinucleotídeo para o direcionamento da expressão de polinucleotídeos endógenos e/ou heterólogos em tecidos foliares de plantas transgênicas.

5 Em um primeiro aspecto, a presente invenção provê uma sequência de polinucleotídeo isolada de plantas de café (*Coffea arabica*) que possua 40%, preferencialmente 60%, mais preferencialmente 75%, mais preferencialmente ainda 90% de identidade com a SEQ ID NO1; sequência reversa de SEQ ID NO1; sondas e iniciadores correspondendo à SEQ ID NO1.

10 Em outro aspecto, a presente invenção provê genes quiméricos compreendendo o polinucleotídeo da presente invenção, ou sozinho, ou em combinação com um ou mais polinucleotídeos conhecidos, junto com células e organismos compreendendo estes genes quiméricos.

15 Em um aspecto relacionado, a presente invenção provê vetores recombinantes compreendendo, na direção 5'-3', uma sequência de promotor de polinucleotídeo da presente invenção, um polinucleotídeo a ser transcrito, e uma sequência de terminação da transcrição. O polinucleotídeo a ser transcrito pode compreender uma região de leitura aberta de um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo de interesse, ou uma região de não codificação, ou não traduzida, de um polinucleotídeo de interesse. A matriz de leitura aberta pode ser
20 orientada tanto na direção "sense" como "antisense". Preferivelmente, a sequência de terminação da transcrição é funcional em uma planta hospedeira. Mais preferivelmente, essa sequência de terminação é proveniente do gene de interesse, mas podendo ser outras descritas no estado da técnica (Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Miller, J.H., Lewontin, R.C. 2000. Regulation of gene transcription In: Modern Genetic Analysis. 3rd edition, W.H. Freeman
25 and Company, New York, NY.) como o terminador do gene da nopalina sintetase de *A. tumefaciens*. Os vetores recombinantes podem ainda incluir um marcador para a identificação de células transformadas.

30 Em outro aspecto, as células de plantas transgênicas compreendendo o vetor recombinante da presente invenção são providas, junto com organismos, como plantas, compreendendo estas células transgênicas, e frutos, sementes e outros produtos, derivados, ou progênie destas plantas. Os propágulos das plantas transgênicas inventivas são incluídos na presente invenção.

Em outro aspecto da presente invenção é provido um método para modificar a expressão de genes em um organismo, como uma planta, incluindo a incorporação estável no genoma do organismo contendo o vetor recombinante da presente invenção.

5 Em outro aspecto da presente invenção é provido um método para produzir um organismo transformado, como uma planta, tendo a expressão de um polipeptídeo dirigida para tecidos foliares. Esse método compreende transformar uma célula de planta com o vetor recombinante da presente invenção para prover uma célula transgênica de condições que conduzem à regeneração e crescimento da planta madura.

10 Ainda em outro aspecto da presente invenção é provido um método para identificação de um gene responsável por uma função ou fenótipo desejado. O método compreende: 1) a transformação de uma célula de planta contendo um vetor recombinante compreendendo uma sequência de promotor de polinucleotídeos da presente invenção ligada operacionalmente a um polinucleotídeo a ser testado, 2) cultivar a célula de planta sob condições que conduzem a regeneração e crescimento da planta madura de modo a prover uma planta transgênica, e 3)
15 comparar o fenótipo da planta transgênica com o fenótipo de plantas não transformadas, ou de tipo selvagem.

Os aspectos acima mencionados e adicionais da presente invenção e o modo de obter os mesmos se tornarão evidentes, e a invenção será melhor compreendida por referência na “Descrição Detalhada da Invenção”.

20 BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do protocolo adotado para amplificação (por *genome walking*) e clonagem do promotor **CaIsoR** a partir de DNA genômico de café.

Figura 2 - Esquema de localização dos elementos regulatórios encontrados no promotor **CaIsoR** por análise comparativa com banco de dados do PLACE (Higo et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. Nucleic Acids Res. 27: 297-300, 1999).
25

Figura 3 - Representação esquemática do vetor pRT103-Gus (~5 Kb) que apresenta o gene repórter *uidA* (GUS) inserido entre os sítios *Bam*HI e *Nco*I sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S.

Figura 4 - Representação esquemática do gene quimérico desenvolvido para a análise
30 funcional da região promotora amplificada via *genome walking* (o promotor não se encontra

em escala). O promotor ***CalsoR*** foi fusionado ao gene repórter *uidA* que codifica a enzima β -glucoronidase (GUS) de *Escherichia coli*.

Figura 5 - Representação esquemática do plasmídeo pCAMBIA-1381 (Cambia) utilizado na construção do gene quimérico visando a posterior transformação estável de tabaco empregando *Agrobacterium tumefaciens*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

No contexto dessa descrição, inúmeros termos serão utilizados e por isso serão melhor detalhados a seguir:

Um “gene quimérico” é um gene compreendendo um promotor e uma região codificadora de diferentes origens. No caso da presente invenção, o gene quimérico compreende o polinucleotídeo da presente invenção ligado a regiões codificadoras de genes endógenos e/ou exógenos.

Uma “seqüência consenso” é uma seqüência artificial na qual a base em cada posição representa a base freqüentemente mais encontrada na seqüência atual comparando-se diferentes alelos, genes ou organismos.

Um “promotor” é a porção do DNA situada à montante da região codificadora de um gene e que contém os sítios de ligação para os fatores de transcrição e as RNA polimerases, os quais são necessários para viabilizar o início da transcrição do DNA em RNA.

“Expressão” é a transcrição ou tradução de um gene estrutural, endógeno ou heterólogo.

“GC box” é um elemento de regulação comum no promotor que pode aumentar a atividade do mesmo.

“TATA box” é um elemento do promotor, localizado a aproximadamente 30 bases acima do sítio de início da transcrição. O TATA box está associado com fatores de transcrição em geral, incluindo a enzima RNA polimerase.

O termo “gene” significa uma unidade física e funcional da hereditariedade, representada por um segmento de DNA que codifica uma proteína funcional ou uma molécula de RNA.

Um “gene endógeno” é um gene próprio da célula ou do organismo.

Um “gene heterólogo” é um gene isolado de um organismo doador e recombinado no organismo receptor transformado. É um gene que não está naturalmente presente na célula ou no organismo.

Um “gene repórter” é uma unidade codificadora cujo produto é facilmente testado, por exemplo, genes CAT, GUS, GAL, LUC e GFP. A expressão de um gene repórter pode ser usada para testar a função de um promotor ligado a esse gene repórter.

5 O termo “EST” refere-se a etiquetas de seqüências expressas (do inglês Expressed Sequence Tags), ou seja, são curtas seqüências das extremidades de uma seqüência de nucleotídeo transcrita (codificando uma proteína ou não). Essas seqüências, derivadas diretamente dos genes ativos, podem ser usadas na identificação em larga escala de genes e na determinação do padrão de expressão dos mesmos.

10 O termo “contig” conforme usado na invenção diz respeito a uma montagem virtual de uma coleção de ESTs correspondentes a um mesmo gene.

O termo “propágulo” como usado na presente invenção significa qualquer parte de uma planta que pode ser usada na reprodução ou propagação, sexual ou assexual, incluindo as mudas.

15 “Sense” significa que a seqüência de polinucleotídeo encontra-se na mesma orientação 5’-3’ em relação à orientação do promotor que a regula.

“Antisense” significa que a seqüência de polinucleotídeo encontra-se na orientação contrária em relação à orientação 5’-3’ do promotor que a regula.

Como usado aqui, o termo “x-mero”, como referência a um valor específico de “x”, refere-se a uma seqüência compreendendo pelo menos um número específico (“x”) de
20 resíduos do polinucleotídeo identificado como SEQ ID NO1. De acordo com formas de realização preferidas, o valor de x é preferivelmente pelo menos 20, mais preferivelmente pelo menos 40, mais preferivelmente ainda pelo menos 60 e mais preferivelmente pelo menos 80. Assim, polinucleotídeos da presente invenção compreendem um polinucleotídeo de 20 meros, 40 meros, 60 meros, 80 meros, 100 meros, 120 meros, 150 meros, 180 meros,
25 220 meros, 250 meros, 300 meros, 400 meros, 500 meros ou 600 meros identificados como SEQ ID NO1 e variantes dos mesmos.

O termo “polinucleotídeo (s)” como usado aqui, significa um polímero de filamento único ou duplo de bases de deoxiribonucleotídeo ou ribonucleotídeo e inclui moléculas correspondentes de RNA e DNA, incluindo moléculas de HnRNA e mRNA, de filamentos
30 tanto “sense” como “antisense”, e compreende cDNA, DNA genômico, e DNA recombinante, assim como polinucleotídeos completamente ou parcialmente sintetizados. Uma molécula de HnRNA contém íntrons e corresponde a uma molécula de DNA

considerando uma complementaridade de modo um a um. Uma molécula de RNAm corresponde a uma molécula de DNA e HnRNA da qual os íntrons foram excisados. Um polinucleotídeo pode consistir de um gene completo, ou qualquer porção do mesmo. Os polinucleotídeos “antisense” operáveis podem compreender um fragmento do polinucleotídeo correspondente, e a definição de “polinucleotídeo” inclui assim todos esses fragmentos “antisense” operáveis. Os polinucleotídeos “antisense” e técnicas envolvendo o uso de polinucleotídeos “antisense” são bem conhecidas no estado da técnica (Sambrook, J.; E.F.Fritsh and T. Maniatis - Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

- 10 Os polinucleotídeos descritos na presente invenção são preferencialmente cerca de 80% puros, mais preferencialmente pelo menos cerca de 90% puros, e mais preferencialmente pelo menos cerca de 99% puros.

O termo “oligonucleotídeo” refere-se a um segmento relativamente curto de uma seqüência de polinucleotídeo, geralmente compreendendo entre 6 a 60 nucleotídeos. Esses oligonucleotídeos podem ser usados como sondas ou iniciadores (“primers”), onde as sondas podem ser empregadas em testes de hibridização e como iniciadores em reações de amplificação de DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR).

- 20 O termo “sonda” utilizado na presente invenção refere-se a um oligonucleotídeo, polinucleotídeo ou um ácido nucléico, podendo ser RNA ou DNA, de ocorrência natural, ou resultante da digestão com uma enzima de restrição e purificada, ou produzida sinteticamente, que seja capaz de se anelar com ou especificamente hibridizando com um ácido nucléico contendo seqüências complementares a ela. Uma sonda pode ser ainda de cadeia simples ou cadeia dupla. O comprimento exato da sonda dependerá de muitos fatores, incluindo temperatura, origem da mesma e uso do método. Por exemplo, dependendo da
- 25 complexidade da seqüência alvo, a sonda de oligonucleotídeo tipicamente contém 15-25 ou mais nucleotídeos, embora ela possa conter menos nucleotídeos. As sondas aqui são selecionadas para serem complementares para diferenciar cadeias de uma seqüência de um ácido nucléico particular. Isto significa que a sonda pode ser suficientemente complementar para ser capaz de “hibridizar especificamente” ou anelar com suas respectivas cadeias-alvo
- 30 sob uma série de condições pré-determinadas. Conseqüentemente, a seqüência da sonda não necessita refletir exatamente a seqüência complementar do alvo. Por exemplo, um fragmento de nucleotídeo não complementar pode ser ligado ao final 5’ ou 3’ da sonda, com o restante

da sequência da sonda sendo complementar à cadeia alvo. Alternativamente, bases não complementares ou sequências longas podem estar intercaladas dentro da sonda se esta apresentar complementaridade suficiente com a sequência do ácido nucléico alvo para anelar especificamente a ele.

5 O termo “primer” como utilizado aqui se refere a um oligonucleotídeo, sendo RNA ou DNA, de cadeia simples ou cadeia dupla, derivado de um sistema biológico, gerado através de digestão com enzimas de restrição, ou produzido sinteticamente que, quando colocado em um ambiente próprio, é capaz de agir funcionalmente como um iniciador da síntese de um ácido nucléico dependente de molde. Quando apresentado com um molde de ácido nucléico
10 apropriado, nucleotídeos trifosfatos adequados precursores de ácidos nucléicos, uma enzima polimerase, cofatores adequados e condições tais como temperatura e pH adequados, o “primer” pode ser estendido em seu terminal 3’ pela adição de nucleotídeos pela ação de uma enzima polimerase, ou com atividade similar, para produzir uma primeira extensão do produto. O “primer” pode variar em comprimento dependendo de condições particulares e
15 requerimentos para sua aplicação. Por exemplo, em aplicações de diagnósticos, o ‘primer’ oligonucleotídeo possui tipicamente de 15-25 ou mais nucleotídeos em comprimento. O ‘primer’ deve ter complementaridade suficiente com o molde desejado para iniciar a síntese da extensão do produto desejado. Isso não significa que a sequência do ‘primer’ deva representar um complemento exato do molde desejado. Por exemplo, uma sequência de
20 nucleotídeo não complementar pode ser ligada ao final 5’ de um ‘primer’ complementar. Alternativamente, bases não complementares podem estar intercaladas dentro da sequência de oligonucleotídeo do ‘primer’, desde que esse tenha complementaridade suficiente com a sequência da cadeia molde desejada para prover funcionalmente um complexo molde-primer na extensão do produto.

25 O termo “hibridizando especificamente” diz respeito à associação entre duas moléculas de ácidos nucléicos de cadeia simples que possuam sequências suficientemente complementares para permitir tal hibridização sob condições pré-determinadas geralmente descritas no estado da técnica (Anderson, M.L.M. *Nucleic Acid Hybridization*. Springer, Bios Scientific Publishers, New York, 1999, 240 p; Innis, Michael A.; Gelfand, David H.; Sninsky, John J.;
30 White, Thomas J. *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press. San Diego, CA, USA. 1990, 482 p).

Em particular, o termo se refere à hibridização de um oligonucleotídeo com uma sequência substancialmente complementar contendo uma molécula de DNA ou RNA de cadeia simples da presente invenção. Condições apropriadas necessárias para realização da hibridização específica entre moléculas de ácidos nucleicos de cadeia simples de complementaridade variada estão bem descritas no estado da técnica (Anderson, M.L.M. Nucleic Acid Hybridization. Springer, Bios Scientific Publishers, New York, 1999, 240 p; Innis, Michael A.; Gelfand, David H.; Sninsky, John J.; White, Thomas J. PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press. San Diego, CA, USA. 1990, 482 p). Uma fórmula comum para se calcular as condições de estrigência requeridas para se ter uma hibridização entre moléculas de ácido nucleico segue abaixo (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press):

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \log [\text{Na}^+] + 0,41 (\%G+C) - 0,63 (\% \text{formamida}) - 600/\text{pb no duplex (sonda)}$$

Como ilustração da fórmula acima, usando $[\text{Na}^+] = [0,368]$ e 50% de formamida, com conteúdo de GC de 42% e um tamanho de sonda médio de 200 bases, a T_m será de 57°C .

Sondas ou “primers” são descritos como correspondendo ao polinucleotídeo da presente invenção identificado como SEQ ID NO1 ou uma variante do mesmo, se a sonda de oligonucleotídeo ou “primer”, ou seu complemento, estiver contido dentro da sequência especificada como SEQ ID NO1, ou uma variante desta.

O termo “oligonucleotídeo” é referido aqui como ‘primers’ e ‘sondas’ da presente invenção, e é definido como uma molécula de ácido nucleico compreendendo de dois ou mais ribo ou deoxiribonucleotídeos, preferencialmente mais do que três. O tamanho exato dos oligonucleotídeos dependerá de vários fatores e da aplicação particular e uso dos mesmos. Oligonucleotídeos preferidos compreendem 15-50 pares de base consecutivas complementares a SEQ ID NO 1. As sondas podem ser facilmente selecionadas usando procedimentos bem descritos no estado da técnica (Sambrook et al “Molecular Cloning, a laboratory manual”, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), levando em consideração a estrigência de hibridização DNA-DNA, recombinação e temperaturas de fusão, e potencial para formação de laços e outros fatores, que são conhecidos no estado da técnica.

A definição dos termos “complemento”, “complemento reverso” e “sequência reversa”, como usados aqui, é ilustrada pelo seguinte exemplo. Para a sequência 5’AGTGAAGT3’, o complemento é 3’TCACTTCA5’, o complemento reverso é 3’ACTTCACT5’ e a sequência reversa é 5’TGAAGTGA3’.

Como usado aqui, o termo “variante” ou “substancialmente similar” compreende seqüências de aminoácidos ou nucleotídeos diferentes de seqüências especificamente identificadas, em que um ou mais nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos é deletado, substituído ou adicionado. As variantes podem ser variantes alélicas, de ocorrência natural, ou variantes de ocorrência não natural. As seqüências variantes ou substancialmente similares dizem respeito a fragmentos de ácidos nucléicos que podem ser caracterizados pela porcentagem de similaridade de suas seqüências de nucleotídeos com a seqüência de nucleotídeo descrita aqui (SEQ ID NO 1), como determinada por algoritmos comuns empregados no estado da técnica. Os fragmentos de ácidos nucléicos preferidos são aqueles cujas seqüências de nucleotídeos têm pelo menos cerca de 40 ou 45% de identidade de seqüência, preferencialmente cerca de 50% ou 55% de identidade de seqüência, mais preferencialmente cerca de 60% ou 65% de identidade de seqüência, mais preferencialmente cerca de 70% ou 75% de identidade de seqüência, mais preferencialmente cerca de 80% ou 85% de identidade de seqüência, mais preferencialmente ainda com cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüência quando comparada com a seqüência de referência. A identidade percentual é determinada por alinhamento de duas seqüências a serem comparadas, determinando o número de resíduos idênticos na porção alinhada, dividindo este número pelo número total de resíduos na seqüência pesquisada e multiplicando o resultado por 100. Esse alinhamento pode ser feito através de softwares existentes na internet, um deles é o BLASTN, que está disponível na página do *National Center for Biotechnology Information/NCBI* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

O termo “vetor” diz respeito a um replicon, tal como um plasmídeo, cosmídeo, bacmídeo, fago ou vírus, no qual outras seqüências genéticas ou elementos (seja DNA ou RNA) possam ser ligadas para serem replicadas quando associadas a ele. Preferencialmente o vetor derivado de vírus é selecionado entre os bacteriófagos, vaccínias, retrovírus ou vírus do papiloma bovino. O “vetor recombinante” é resultante da combinação de um vetor comercial com genes quiméricos, ou o polinucleotídeo da presente invenção operacionalmente ligado a um polinucleotídeo endógeno e/ou heterólogo de interesse que por sua vez está operacionalmente ligado a um sinal de terminação da transcrição. Tais vetores podem ser obtidos comercialmente, incluindo Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Stratagene (La Jolla, Calif.), Invitrogen (Carlsbad, Calif.), New England Biolabs (Beverly, Mass.) e Promega (Madison, Wis.). Alguns exemplos de vetores utilizados na presente invenção, mas

não limitados a, são os vetores pGEM® -T Easy (Promega), pRT103 e pCAMBIA-1381 (Cambia).

O termo “clone” como usado na presente invenção corresponde a fragmentos de DNA inseridos no interior de uma bactéria e propagados de forma assexuada. Esses fragmentos de DNA estão normalmente ligados a um vetor de clonagem como descrito acima.

O termo “seqüências acentuadoras de expressão” corresponde aos amplificadores (“enhancers”) que potenciam a taxa de transcrição e que podem estar situadas a grandes distâncias do promotor (antes ou depois, “upstream” ou “downstream”). Estes amplificadores não são específicos e potenciam a transcrição de qualquer promotor que estiver na sua vizinhança. A eficiência da expressão de um gene em um tecido específico depende da adequada combinação e integração dos amplificadores, dos promotores e das seqüências adjacentes.

O primeiro intensificador descoberto como um estimulador da transcrição de genes eucariotos foi o SV40 (presente no genoma do Vírus 40 de Símio). Após a descoberta desse intensificador, outros foram identificados em diferentes genomas virais como HSV-1, AMV, TMV, HPV-16.

O termo “operacionalmente ligado” significa que as seqüências regulatórias necessárias para expressão da seqüência codificadora são colocadas na molécula de DNA em posições apropriadas relativa à seqüência codificadora para efeito de expressão dessa. Essa mesma definição é às vezes aplicada para o arranjo de seqüências codificadoras e elementos controladores da transcrição (por exemplo, promotores, auxiliares ou “enhancers” e elementos ou seqüências de terminação) em um vetor de expressão. Uma região codificadora exógena é tipicamente flanqueada por regiões regulatórias operacionalmente ligadas que regulam a expressão da referida região em uma célula transformada (podendo ser microorganismo, vegetal ou animal). Uma região regulatória típica operacionalmente ligada a uma região codificadora exógena inclui um promotor, isto é, um fragmento de ácido nucléico que pode modular a transcrição de regiões codificadores exógenas e que está posicionado na região 5’ da mesma. No caso da presente invenção a região regulatória diz respeito às regiões substancialmente similares a SEQ ID NO 1. Para auxiliar no aumento da transcrição de um determinado polinucleotídeo, a seqüência promotora da presente invenção poderá estar ligada a outras seqüências regulatórias já descritas, tais como: ATATT (elemento de forte expressão na raiz), AACAAAC e

GCCACCTCAT (elementos relativos a expressão específica em sementes), CACGTG e CCTACC (ambas seqüências podem ser estimuladas por um fator de estresse), entre outros [Ai-Min Wu et al., 2006 Isolation of a cotton reversibly glycosylated polypeptide (GhRGP1) promoter and its expression activity in transgenic tobacco, Journal of Plant Physiology 163: 426-435].

Uma “seqüência de terminação” é uma seqüência de DNA que sinaliza o final da transcrição. São exemplos de seqüências de terminação, mas não estão limitados a, o sinal de terminação de SV40, sinal de adenilação de HSV TK, sinal de terminação do gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* (NOS), sinal de terminação do gene da octopina sintetase, sinal de terminação do gene 19S e 35S do CaMV, sinal de terminação do gene da álcool desidrogenase de milho, sinal de terminação do gene da manopina sintetase, sinal de terminação do gene da beta-faseolina, sinal de terminação do gene da ssRUBISCO, sinal de terminação do gene da sucrose sintetase, sinal de terminação do vírus que ataca o *Trifolium subterranean* (SCSV), sinal de terminação do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans* e outros semelhantes. A presente invenção provê uma região regulatória de polinucleotídeos isolados que podem ser empregadas na manipulação de fenótipos de plantas, junto com polinucleotídeos isolados compreendendo estas regiões regulatórias. Mais especificamente a presente invenção está relacionada ao promotor ou seqüência regulatória que ocorre naturalmente em plantas de café (*Coffea arabica*), responsável pela expressão de uma proteína da família das isoflavonas em resposta a dano mecânico nessa espécie vegetal. O promotor de café foi isolado do gene que codifica a isoflavona redutase e foi denominado na presente invenção de **CaIsoR** (SEQ ID NO1).

O polipeptídeo de interesse específico pode ser expresso especificamente em tecidos foliares de plantas através da incorporação de genes, ou seqüências de codificação, codificando um polipeptídeo, ligado operacionalmente a seqüência do promotor da presente invenção (SEQ ID NO 1), no genoma de um organismo, como uma planta. Uma diminuição na quantidade do polipeptídeo pode ser obtida por transformação da planta com cópias “antisense” destes genes.

O polinucleotídeo da presente invenção foi isolado de plantas de café, mais especificamente de *Coffea arabica*, mas ele pode ser alternativamente sintetizado usando técnicas de síntese convencionais. Especificamente o polinucleotídeo isolado da presente invenção inclui a seqüência identificada como SEQ ID NO1; o complemento da seqüência

identificada como SEQ ID NO1; complemento reverso da sequência identificada como SEQ ID NO1.

Estudos da atividade do promotor da presente invenção são detalhados nos exemplos deste relatório.

5 O polinucleotídeo da presente invenção pode ser identificado em seqüências de DNA genômico de plantas para as quais informações genômicas encontram-se disponíveis ao público, ou isolado de várias bibliotecas de polinucleotídeos, ou pode ser sintetizado usando técnicas que são bem conhecidas no estado da técnica (Sambrook et al "Molecular Cloning, a laboratory manual", CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). O polinucleotídeo pode ser
10 sintetizado, por exemplo, usando sintetizadores automatizados de oligonucleotídeos (por exemplo, sintetizador de DNA OLIGO 1000M Beckman) para obter segmentos de polinucleotídeos de até 50 ou mais ácidos nucleicos. Diversos destes segmentos de polinucleotídeos podem ser então ligados usando técnicas de manipulação de DNA padrões que são bem conhecidas no estado da técnica (Sambrook et al "Molecular Cloning, a
15 laboratory manual", CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Uma técnica de síntese de polinucleotídeo convencional e exemplar envolve a síntese de um segmento de polinucleotídeo de filamento único, tendo, por exemplo, 80 pares de bases, e hibridizando este segmento a um segmento complementar de 85 pares de bases, sintetizados, para produzir um 'overhang' de 5 nucleotídeos. O próximo segmento pode ser então sintetizado de modo
20 similar, como um 'overhang' de 5 nucleotídeos no filamento oposto. As extremidades "pegajosas" ou coesivas asseguram uma ligação apropriada quando as duas porções são hibridizadas. Deste modo, o polinucleotídeo desta invenção pode ser sintetizado completamente *in vitro*.

Como observado acima, a seqüência do promotor da presente invenção pode ser
25 empregada em vetores recombinantes e/ou de expressão para acionar a transcrição e/ou expressão de um polinucleotídeo de interesse em tecidos foliares. O polinucleotídeo de interesse pode ser endógeno ou heterólogo para um organismo, por exemplo, uma planta, a ser transformada. Os vetores recombinantes e/ou de expressão da presente invenção podem ser assim empregados para direcionar a transcrição e/ou expressão de um polinucleotídeo,
30 por exemplo, um gene que está presente na planta de tipo selvagem, ou pode ser empregado para prover transcrição e/ou expressão de uma seqüência de DNA que não é encontrada na

planta de tipo selvagem, incluindo, por exemplo, um gene que codifica um gene repórter, como GUS.

Em algumas formas de realização da presente invenção, o polinucleotídeo de interesse compreende uma matriz de leitura aberta que codifica um polipeptídeo de interesse. A matriz
5 de leitura aberta é inserida no vetor em uma orientação “sense” e a transformação com essa construção genética/vetor recombinante irá geralmente resultar em uma expressão do polipeptídeo selecionado na folha de plantas. O polipeptídeo de interesse, que será regulado pelo promotor da presente invenção, poderá ser inserido no vetor na orientação “sense”, “antisense” ou em ambas as direções. A transformação com um vetor recombinante e/ou de
10 expressão contendo o promotor da invenção regulando a expressão do polinucleotídeo de interesse na orientação “antisense” ou em ambas as orientações (sense e antisense) irá geralmente resultar na expressão reduzida do polipeptídeo selecionado nos tecidos foliares.

O polinucleotídeo de interesse, contendo uma região de codificação, é ligado de modo operativo a uma sequência do promotor de polinucleotídeo da presente invenção de modo
15 que a célula hospedeira seja capaz de transcrever um RNA acionado pela sequência do promotor ligada ao polinucleotídeo de interesse. A sequência do promotor de polinucleotídeo está geralmente posicionada na extremidade 5’ do polinucleotídeo a ser transcrito. O uso de promotor tecido-específico, como a sequência do promotor do gene que codifica a isoflavona redutase de *Coffea arabica* identificada como SEQ ID NO1, irá direcionar a transcrição do
20 polinucleotídeo de interesse apenas em tecidos foliares da planta transformada.

O vetor recombinante ou vetor de expressão da presente invenção também pode conter um marcador de seleção que é eficaz em células do organismo alvo, como uma planta, para permitir a detecção de células transformadas contendo o vetor recombinante inventivo. Estes marcadores, que são bem conhecidos, tipicamente conferem resistência a uma ou mais
25 toxinas. Um exemplo deste marcador é o gene *np1II*, cuja expressão resulta em resistência a canamicina ou neomicina, antibióticos que são geralmente tóxicos para células de plantas em uma concentração moderada. As células transformadas podem ser assim identificadas por sua capacidade de crescer em meio contendo o antibiótico em questão. Outros marcadores que podem ser utilizados para construir vetores recombinantes e/ou de expressão contendo o
30 polinucleotídeo da presente invenção podem ser, mas não estão limitados a: gene *hpt* confere resistência ao antibiótico higromicina, o gene *manA* e o gene *bar*.

O sistema que usa o gene *manA* (que codifica a enzima PMI - phosphomannose isomerase) de *Escherichia coli* (Miles e Guest, 1984. Complete nucleotide sequence of the fumarase gene *fumA*, of *E. coli*. Nucleic Acids Res. 25; 12: 3631–3642), tendo a manose como agente seletivo, é um dos novos sistemas sugeridos como alternativos aos dois primeiros descritos acima (Joersbo et al., 1998 Parameters interacting with mannose selection employed for the production of transgenic sugar beet. *Physiologia Plantarum* 105: 109 - doi:10.1034/j.1399-3054.1999.105117.x). As espécies vegetais que não metabolizam manose sofrem severa inibição de crescimento quando esta é oferecida como única fonte de carbono em meio de cultura. Os efeitos adversos e inibitórios do uso da manose são conseqüências do acúmulo de manose-6-fosfato, produto da fosforilação da manose por uma hexoquinase. A PMI promove a interconversão de manose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, permitindo assim que a primeira possa ser catabolizada na via glicolítica (Souza Júnior et al. 2001. Análise de sistemas gene marcador/ agente seletivo alternativos para seleção positiva de embriões somáticos transgênicos de mamoeiro, *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, 13: 365-372; Joerbos, 2001, Advances in the selection of transgenic plants using non-antibiotic marker genes, *Physiologia Plantarum* 111: 269-272). O gene *bar* (que codifica a enzima PAT – phosphinothricin-N-acetyltransferase) de *Streptomyces hygroscopicus* (Murakani et al., 1986 The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster. *Molecular and General Genetics* 205: 42-50), tendo o glufosinato de amônio (PPT) como agente seletivo, é, dentre os sistemas tipo *gene de tolerância a herbicida*, um dos mais amplamente empregados pela engenharia genética no desenvolvimento de OGMs vegetais. PAT inativa herbicidas que apresentam o PPT como composto ativo mediante detoxificação deste. A detoxificação, que é resultante da acetilação do grupamento amino livre presente no PPT, torna este incapaz de competir de forma inibitória com a glutamina sintetase (GS), possibilitando assim a remoção da amônia tóxica da célula vegetal pela conversão de glutamato em glutamina, reação esta catalizada pela GS (Lindsey, 1992. Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* 360: 481 - 484).

Alternativamente, a presença do gene quimérico em células transformadas pode ser determinada por meio de outras técnicas conhecidas no estado da técnica (Sambrook et al. “Molecular Cloning, a laboratory manual”, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), como Southern blot e PCR.

As técnicas para ligar de modo operativo os componentes dos vetores recombinantes ou de expressão inventivos são bem conhecidas no estado da técnica e incluem o uso de ligadores sintéticos contendo um ou mais sítios de reconhecimento para endonucleases de restrição, como descrito, por exemplo, em Sambrook et al. ("Molecular Cloning, a laboratory manual", CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Genes quiméricos da presente invenção podem ser ligados a um vetor tendo pelo menos um sistema de replicação, como por exemplo, o de *E.coli*, assim após cada manipulação, as construções resultantes podem ser clonadas e seqüenciadas.

Vetores recombinantes e/ou de expressão da presente invenção podem ser usados para transformar uma variedade de organismos incluindo, mas não limitando a plantas. As plantas que podem ser transformadas usando vetores recombinantes e/ou de expressão da presente invenção incluem angiospermas monocotiledôneas (por exemplo gramíneas, milho, grãos, aveia, trigo e cevada...), angiospermas dicotiledôneas (por exemplo *Coffea arabica*, *Arabidopsis*, tabaco, legumes, alfafa, aveia, eucalipto, bordo...), e gimnospermas (por exemplo pinheiro, espruce branco, lariço...). Os protocolos de transformação de plantas já são bem conhecidos no estado da técnica (Manual de transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CENARGEM, Capítulo 3 e 7, 1998). Em uma forma de realização preferida, os vetores recombinantes e/ou de expressão da presente invenção são empregados para transformar plantas dicotiledôneas. Preferivelmente, a planta é selecionada da família das Rubiaceae, mais preferivelmente da espécie *Coffea arabica*. Outras plantas podem ser transformadas de modo útil com o vetor recombinante e/ou de expressão da presente invenção incluem, mas não são limitadas a: *Anacardium*, *Anona*, *Arachis*, *Artocarpus*, *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Carica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Carthamus*, *Cocos*, *Coffea*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Elaeis*, *Fragaria*, *Glycine*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyoseyamus*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Olea*, *Oryza*, *Panicum*, *Pannasetum*, *Passiflora*, *Persea*, *Phaseolus*, *Pistachia*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Psidium*, *Raphanus*, *Ricinus*, *Secale*, *Senecio*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sorghum*, *Theobromus*, *Trigonella*, *Triticum*, *Vicia*, *Vitis*, *Vigna*, e *Zea*.

O sinal de terminação da transcrição e a região de poliadenilação da presente invenção inclui, mas não está limitado a, sinal de terminação de SV40, sinal de adenilação de HSV TK, sinal de terminação do gene da nopalina sintetase de *A. tumefaciens* (nos), sinal de

terminação do gene *RNA 35S* do CaMV, sinal de terminação do vírus que ataca o *Trifolium subterranean* (SCSV), sinal de terminação do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans*, e outros semelhantes. Preferivelmente o terminador da transcrição utilizado na presente invenção é o terminador do gene que codifica para a proteína isoflavona reductase de café.

5 Os vetores recombinantes e/ou de expressão da invenção podem ser introduzidos dentro do genoma da planta hospedeira desejada através de uma variedade de técnicas convencionais. Por exemplo, introdução mediada por *A. tumefaciens*; eletroporação; fusão de protoplasto; injeção em órgãos reprodutivos; injeção em embriões imaturos; microinjeção de protoplastos de células de plantas; utilizando-se métodos balísticos, tais como
10 bombardeamento de partículas recobertas com DNA e outros. A escolha da técnica irá depender da planta a ser transformada. Por exemplo, plantas dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas e gimnospermas podem ser transformadas empregando a tecnologia baseada no plasmídeo Ti de *Agrobacterium*. Os vetores recombinantes e/ou de expressão podem ser combinados com regiões flangeadoras de T-DNA apropriadas e introduzidas
15 dentro de vetor convencional do hospedeiro *A. tumefaciens*. A função de virulência do hospedeiro *A. tumefaciens* direcionará a inserção das construções gênicas e marcador adjacente dentro do DNA da célula vegetal quando essa é infectada pela bactéria. Técnicas de transformação mediadas por *A. tumefaciens*, incluindo desarmamento e o uso de vetores binários, são bem descritas na literatura científica (como mencionado no pedido de patente
20 US 20020152501, Horsch et al. Science 233:496-498, 1984; e Fraley et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803, 1983).

Técnicas de microinjeção são conhecidas no estado da técnica e bem descritas na literatura científica e patentária. A introdução de vetores recombinantes e/ou de expressão utilizando-se precipitações de polietileno glicol é descrita em Paszkowski et al. (Embo J.
25 3:2717-2722, 1984) e como mencionado no pedido de patente US20020152501. Técnicas de eletroporação são descritas em From et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5824, 1985) e como mencionado no pedido de patente US20020152501. Técnicas de transformações balísticas são descritas em Klein et al. (Nature 327:70-73, 1987) e como mencionado no pedido de patente US20020152501. A introdução dos vetores recombinantes e/ou de
30 expressão da presente invenção pode ser feita em tecidos, como tecido foliar, células dissociadas, protoplastos, sementes, embriões, regiões meristemáticas, cotilédones, hipocotilédones, e outros. Preferencialmente a presente invenção utiliza a transformação

através da introdução mediada por *A. tumefaciens* utilizando a *A. thaliana* com planta modelo (Clough et al. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *A. thaliana*. Plant J. 16: 735-743). No entanto outros métodos de transformação podem ser utilizados para inserir vetores recombinantes e/ou de expressão da presente invenção, tais como a biobalística, que consiste em uma técnica de transformação direta do DNA que utiliza microprojéteis impulsionados em alta velocidade para carrear o DNA para o interior das células [Rech, E.L; Aragão, F.J.L. Biobalística. In: Manual de Transformação Genética de Plantas (Brasileiro, A.C.M. & Carneiro, V.T.C. eds.), EMBRAPA Serviço de Produção de Informações –SPI. 1998, 106pp], e via tubo polínico. O método de transformação via tubo polínico foi divulgado pela primeira vez por Zhou et al. (Zhou, G., Wang, J., Zeng, Y., Huang, J., Qian, S., and Liu, G. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. Meth. in Enzymol. 101:433-448, 1983) e consiste na aplicação de uma solução de DNA na parte superior da maçã jovem do algodoeiro após a polinização. Utilizando esta técnica, o DNA exógeno pode alcançar o ovário através da passagem deixada pelo tubo polínico e integrar as células zigóticas já fertilizadas, porém não divididas.

Uma vez que as células foram transformadas, por qualquer uma das técnicas mencionadas acima, as células tendo o vetor recombinante e/ou de expressão da presente invenção incorporado em seu genoma podem ser selecionadas por meio de um marcador, como o marcador de resistência a higromicina ou a canamicina. As células de plantas transformadas podem então ser cultivadas para regenerar uma planta inteira que possua o genótipo transformado e, finalmente, o fenótipo desejado. Tais técnicas de regeneração contam com a manipulação de certos fitohormônios em meio de crescimento de cultura de tecidos, tipicamente contendo um marcador biocida e/ou herbicida, que deve ser introduzido junto com a sequência de nucleotídeos desejada. Regeneração de plantas a partir de cultura de protoplastos é descrita em Evans et al. (Evans et al, Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, pp. 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; e Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985, como mencionado no pedido de patente US20020152501). A regeneração pode ser também obtida através de calos de planta, explantes, órgãos, ou parte da mesma. Tais técnicas de regeneração são bem descritas no estado da técnica, tais como em Leelavathi et al. [Leelavathi et al. 2004. A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for cotton (*G. hirsutum* L.): Embryogenic calli as a source to generate large numbers

of transgenic plants, Plant Cell Rep 22:465–470]. A transformação de café é realizada eficientemente através da técnica de bombardeamento de micropartículas, como descrito em Ribas et al. (Ribas, A.F., Kobayashi, A.K., Pereira, L.F.P, Vieira, L.G.E. 2005. Genetic transformation of *Coffea canephora* by particle bombardment. Biol. Plantarum 49: 493-497).

5 A produção de RNA em células pode ser controlada por escolha da seqüência do promotor, por seleção do número de cópias funcionais ou através do sítio de integração de polinucleotídeos incorporados no genoma hospedeiro. Um organismo pode ser transformado utilizando um vetor recombinante e/ou de expressão da presente invenção contendo mais de uma matriz de leitura aberta de codificação para um polipeptídeo de interesse.

10 O polinucleotídeo isolado da presente invenção também tem utilidade no mapeamento do genoma, em mapeamento físico e em clonagem posicional de genes. A seqüência identificada como SEQ ID NO1 e suas variantes podem ser usadas para projetar sondas e iniciadores de oligonucleotídeos. As sondas de oligonucleotídeos projetadas usando o polinucleotídeo da presente invenção podem ser usadas para detectar a presença do
15 promotor do gene que codifica a proteína isoflavona redutase em qualquer organismo tendo seqüências de DNA suficientemente similares em suas células usando técnicas bem conhecidas no estado da técnica, como as técnicas de hibridização de DNA e *dot blot* (Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Anderson, M.L.M. Nucleic Acid
20 Hybridization. Springer, Bios Scientific Publishers, New York, 1999, 240 p).

Os iniciadores de oligonucleotídeos projetados usando o polinucleotídeo da presente invenção podem ser usados para amplificações de PCR. O polinucleotídeo da presente invenção também pode ser usado para etiquetar ou identificar um organismo ou material reprodutivo do mesmo. Esta etiqueta pode ser obtida, por exemplo, por introdução
25 estável de um identificador de polinucleotídeo heterólogo, não funcional, não disruptivo, em um organismo, sob o controle do polinucleotídeo da presente invenção.

EXEMPLOS

A presente invenção é ainda definida nos seguintes exemplos. Deve ser entendido que esses Exemplos, enquanto indicam parte da invenção, são colocados como forma de
30 ilustração somente, não tendo, portanto, qualquer cunho limitante do escopo das presentes invenções.

Técnicas usuais de biologia molecular tais como, transformação de bactérias e eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose, são referidos através de termos comuns para descrevê-los. Detalhes da prática dessas técnicas, bem conhecidos no estado da técnica, são descritos em Sambrook, et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Várias soluções utilizadas nas manipulações experimentais são referidas por seus nomes comuns tais como “agarose”, “TBE”, “miniprep”, etc. As composições dessas soluções podem ser encontradas na referência Sambrook, et al. (supracitada).

Exemplo 1

10 Comparação da sequência do promotor da presente invenção com as sequências de promotores descritos no estado da técnica

O promotor da presente invenção foi comparado com sequências de promotores descritas em documentos de patentes, tais como: WO2007044992 (promotores de café específicos para expressão de genes em sementes); WO2007005980 (promotor do gene que
15 codifica uma dehidrina de café); WO20077044751 (promotores que codificam genes envolvidos na via biosintética de ácidos clorogênicos em plantas de café); US6610840 (promotor de batata específico para mesófilo); US6800794 (promotor de alfafa induzível por estresse biótico); US7153953 (promotor de café com expressão específica em folha). As sequências foram analisadas através de um alinhamento gerado pelo aplicativo Clustal X
20 1.83 empregando os parâmetros “default”. O resultado do alinhamento foi analisado no programa Genedoc, para cálculo da % de identidade entre as sequências. A Tabela 1 e o alinhamento abaixo apresentam os resultados obtidos e mostram que o promotor da presente invenção é significativamente diferente dos promotores descritos no estado da técnica.

Tabela 1. Porcentagem de identidade entre os promotores descritos no estado da técnica e o promotor da presente invenção.

DOCUMENTOS DE PATENTE	IDENTIDADE
US6800794	42%
US6610840	36%
US7153953	38%
WO200700598	31%

	Ca IsoR	: AAR-AAAATTACAAAC-ATTATGAGAAATTGTTAAAGGAA-ATTGATTTCATA--TT-ATCATGATCGTTGAT
5	US6800794	: AGA-AAAATCTTTGCTTA-GTCAAAAGAGAAG---AATATTCTGA-ATTAAATTCATA--CTGATGATTTTAAAGCT
	US6610840	: TGTTAAAATTGCACATAACGAGTGA-CACTCAACTGTTGAGTACCATTGATCCGTCATCTGTGCGATAACTTTGAT
	US7153953	: TAAATAATTAAAGTTTTATGTCTTCTTCCTCCTTTAATGTTCAA--TTAGCTGCTA-----GGTAGGTGTGGG-
	WO20070059	: AGA-GAATCATCTTCCGGAAGAGGGATTCTTCTGGGCAAAACGAGAAAGGATTAAGTTCGTCTGAGTACAAAG
10		
	Ca IsoR	: CCAAAGGATCATAGCATTTG---GTAAC-TTCAGTTGATTTCTTTTGTTTTCCATTGG-GCAACCTGTCT-CTGCC
	US6800794	: GTAGATATTAC-GTATTA---GTTAA-AAAAATCAAATTATTATATTTA--ATTGGTGTGTCTATTCAGGTTT
15	US6610840	: AAGGATATTTCAGGCATCAGACATGTCAC-CTCTATGAACCTGGCTTTT---TAAAAATAAAATAAAAGTTT
	US7153953	: GAAGTATATGG-ATAGTTG---TCGG-AGGAACATTTTT---TTTGTGAGACAATAACATTGTATTA---CC
	WO20070059	: GTGAGCATACAGTCACGGTTTATTAGGAATGGAAGGATGGAACCTTTTCCAGTAGTGAACACATATTTTGTCA
20		
	Ca IsoR	: AGCT-AATTTCTGACCTTACAAGATAATACATA-ATCTGACCTTACAATA-TATTATCTTACAGAT-----AATTCT
	US6800794	: AACCTAAGTTGAGGTTTATCTTAAGTTACTA-AGTTGAGTGGAGAAGAA-GACTATTTGCTCGGAGGAGGACGCCC
	US6610840	: GGCATCAACCACTTCTGTACTTAGGCGTATCCAGAATAAAATGTTG-TTCCTCATTCGCAATTAGTTGTTTG
25	US7153953	: TATTTTACCTTAACTATAAGAAAGGG---AGCTAAAGAACTCGG-TAGGAACACACATACACAGCCCT-
	WO20070059	: TGGTGGCTTGTACCATTAACCGAAATGTTCTCATCCGTTCTATTAACATTAGGCTTAGTCATTTAAATTTT
30		
	Ca IsoR	: G-----ACCTACCTAGAAGATATTAATCT-----TACTAG---ATAATT--CTGAC-CTTAATCTAATTCTA
	US6800794	: AGTA---GAATGGTTATATTTTTTATTTT---TGTAAGGAGTAGAGTG--GTTAT-GTGTCTGAATAATTTT
	US6610840	: CACA---CGGAAGACTTCGAAATTTACTAATTGTGTTCTCGTCCGTCGAACTG--GCTCACACTTGGTGGTCAATTTT
35	US7153953	: -----ACTAAATTAAGAGATATTTGA-----CACCACCTTTAAATTT--TGTTCACTGCAGGTGAAATTTGAG
	WO20070059	: TACATCCGCATCTCTCTCTGATTCTCTGATTCTGCGATTCTGAGATTCCACAGTTGTCTTCAGAGGGCTACGAAATGCA
40		
	Ca IsoR	: ACCTTACAAGATATTATCTTACA-AG-ATAATTTT-----TGACCTTACATGACCTTACAAGATATTGTGAGAACCA-
	US6800794	: TTTTGTAGGTAATGTATGACAA-ATAATTTGGAAACAGCCCTGTCAAAGAGTACACGGTAAAGGGGTGGTAT
	US6610840	: ACTTCTCAAGGTAGCAATAGAGAATATGATGTGCG--TCTCCTCATATTTATCCGAACAATAAAAAATCATATCTGT
45	US7153953	: CCCCTACATAC-----TAGACAG-GTCCCTCTTGACAATCACGAGCCAAGCTCCGTGGTTGTTGGAGGACAA-
	WO20070059	: TGCAGGGAGCGGCAATCAGCGATAAATTACCCTGTCAAGGAAGCTGGCATTGTCTCGTGCAATGTAGTTGCTTT
50		
	Ca IsoR	: AGAATCGAAGTTGATGTGCTTTTTTTGTTTTTCTTTTCAAAATATTGATGACATGTGCAATTGCGCA--TGC-TT
	US6800794	: ACAAGAGTGCCTCGCTCTTCTTCAGGTCATTGGTTGCTACAGTTAGGAAATTTGGGAGGAAAGAAATAA-CA
	US6610840	: TTGCATATGCATGATCACACACCCCCCCCCCCCCCGCCCTGATTCCCTCGATTACATTAAATATAATCAT-CTA
55	US7153953	: TTATGAATAAAGAGGCAACGGCCATCA-CACCAGAGTCTATGTCCGTCAGAAATGTACTGAAGAACATGATGTAC
	WO20070059	: TCGAGATCACTCAAGGGAGACCATAACAGATGGGGAAATGAATTCAATATAATTAGCAAAAAGGAAGATGA-TAC
60		
	Ca IsoR	: CCATTATTTTTTTTAAACA-----AAGGTTGGGCGTCAGTTTC-AT-----CTCGACCATACATATCT-AGGAT
	US6800794	: ACTGTATAACGTCAAACAATGCTCGGTTATCAGGTGGTAGATAAG-ATTAACTTTCTTGCTTTTGC-ATGGGTCAAGGC

US6610840- : CAAGAATTCCGTT-GGCTTCATTGTGTGTTTACAT---ATTCG-TTTCTAACCACCCACC-CGGTGAAACA
 US7153953- : CAAATAAAATACTTAAGAAACGATAAGTTTACTCATAACATGT-AGTCTGAGCAAGGGAATGGGATCGCAGAGGA
 WO20070059 : GGGTCAGGGCGTCCGTGCATCATGAAC TAGTTCTTTTCATTGTGTCGATGCTGTTTACTGTTTATTCATGAAAT

5

Ca IsoR : TGACCATACGTTGCTTACAA--GGTTCTATAGAAA---TCACCTACCAATACAGTTATTATATGA---TAGCAAAAT
 US6800794 : AAAGTTTCTTCTCTTCCATTCAATTACCATGGG---TGGCGGCTTAGTCCGTTTACCATACGG---ACATAGGCT
 US6610840- : TTGCTCTCCACTGGCTCATGTATGACACAAA---TGAACCTCAAACCTGGGCAGGTGAATATGCTCTAGGAGCAT
 US7153953- : AAAGACCCTGACATTCTG-----CACTGTAGC---TG---CTGCAGATGATTCTGGGCTCGA---AAACGAAT
 WO20070059 : TAGTTTGCATATATGCGTGGCGTTTACCATCCATTCTAAATCGATATCTATGGGCCGAATACGCGTTGGAGACAT

10

Ca IsoR : TTGACATGTAACCTCTTG-GTAAGGAAGTATCG---CTTTA---TCACCTGAACCAACTTATGTTGACATTTGCGA
 US6800794 : AAGAGTTTCTTTTCTC-GTTTTTCCATTCAAGTCTTTA---TGTAAACTGTTTTGACTTTGGTGTCTCTCCCT
 US6610840- : TGTATTATCATGCAATGCATCAACAAGGAGAGAGCTTAAGCCAGAGTAATTGATGCATCAAAAGTATGACAT
 US7153953- : CAAAGAAATTTTATTTTATTTTTTTGTGTTTGGGTGAAAAAAGATATATCGACTGGACCCAAAATAACCAACC
 WO20070059 : CATTGGCTTGCCTCTCAATCCCATCTCTATCTATGACGGATCGGGTCATGATGTTGATCCTTTCAACTTTGACT

20

Ca IsoR : AAGAATCCATAGACTAGAGATTAACTT-----TGGAGCATTTT---GAAATTTAGAGGCCAATAGAGATCA
 US6800794 : AGTACACCTTGTGCTAGGAGACTATTTGATTGGTAATATATTTCTTTTACCTCTAAAAAAAATCAGGAAG
 US6610840- : GCAGGTGGAGTTAGTACAGCTTCAGTAATT-TGGCTCAGGCTTCTTAGATCAACATGTCTCAGCTTAATTAAATG
 US7153953- : GTTACTTATCATCTCTCATTCACGTCCT-----CCATTCTTCGA-----AAAACAGATGAGATAAGTGA
 WO20070059 : AGATGGGATTGTGTTCCGCTGTTGTAACTTGTACTGACCGACTCAGAAGACAGCGGATCTGACTTACCACGTGTC

25

Ca IsoR : AAAGGAAACGGCAGCGCAGGCTATC---ATTTTCAAT---ATTTTCTCTATATATTAATCTTGC---ACGGAGCTG
 US6800794 : AAAAAGATAAAGGTCCGAAGTGTACCTGATTATATAAAT---AAATGATTAAATTGAATATAAGATAAATACTAAATG
 US6610840- : GAGGAATCCAAAGATTATGTTGTAAATCATTTCTATCCTAGATGGTCTATCGGAATCAATTTATTTATCTCTATC
 US7153953- : TTGAAATCATTCGCCCGTGCCAGTGCGGTGT-----GGTGGTAAATGATAGGCTAGGTCCAAAACCTTGTG
 WO20070059 : TCTTTGTGAAATTTAAAGGCATTTTCTTCT-----GTBCATAGTTAAATGTATGT-GATTATTAAAGA

30

35

Ca IsoR : CAGCC-TATGGTC---CTAAG---CACATTCTGCTCTCTTCACTCATCAAATAC---AGATTGTATCCATTTGCAA
 US6800794 : TTTTC-TATAATTAGTTAAGAGATGAAATATGTATTTTCCCAATTAT-ATATTATGTAGTTTATTTATTTTAT
 US6610840- : CAATT-CATTATATTTTCAAA-----AGTTATG-AGTCCACGAAATATGTGACGTGGGTAAAGAAGCCATGCCAGC
 US7153953- : CCTTCATGGGGTCA---TAAAG---TAGGGATGTGGTGAACCACATATCCATGGCGGACGATGGT-CTAGATCAGGA
 WO20070059 : TCGTT-TGGTATTATTCAAG---GATGGATGATTGGATGCAAGGGATATCTGATAT-ATATCATACCC-TTCCAAA

40

45

Ca IsoR : CAGTACTTTACCATCCTAGAGTTGGAATGGCTGTCAAGGCAAGGTTTGATCTTTGGCGCCCGGATACATTG-G
 US6800794 : ACGTTGTTTGTCTTTGAAATTTGAGTGGTCTTGGAAGGAGAGAA-ATCAAAAGAGAAAGAAATTAATAGTAGAT-GC
 US6610840- : CAGTGGATATAGAAACAAACATGTAATAAAGAGAACAATATGAGTTTCGAAGAGAACAAGTTAGCATAGG-AC
 US7153953- : TGAATGATTTTGGCCGTTAGATACAGGAACCATGCAAGAGCAAGTGTGCATTATATATAGAGGGTCTGTAGAGC
 WO20070059 : TTCAGAACCATGA--CGTATTTAATATCCCCAGCCGAAGACACGTGCCGTGATGTCTTATAGGTGGCAATACACTT-CA

50

Ca IsoR : AATACGTAGTGGAGGCAAGTTC
 US6800794 : AATAATTTTGTAGTCCAAATAA
 US6610840- : GAGAATCACATTATCTTAGGTTC
 US7153953- : AATAGCCATATGAT-----TCA
 WO20070059 : GCTTCTCTGCTAATACGTGTCA

55

Exemplo 2 - Isolamento da sequência de DNA promotora do gene da proteína isoflavona redutase

Para identificação da região promotora da presente invenção foram selecionadas seqüências expressas ou ESTs que apresentassem padrão de expressão em folhas. Estes ESTs foram selecionados *in silico* no banco de dados do Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>). Para tal foram utilizadas as ferramentas de *northern* eletrônico disponíveis no site. A identificação dos ESTs expressos exclusivamente em folhas foi feita comparando-se os contigs presentes nas bibliotecas de folha com os contigs presentes nas demais bibliotecas. Os contigs formados por seqüências provenientes unicamente de bibliotecas de folha foram considerados tecido-específicos. Tais contigs foram então analisados quanto à presença dos mesmos em bibliotecas oriundas de tecidos foliares submetidos a determinados estresses (folhas infectadas com bicho-mineiro e ferrugem; folhas de plantas com estresse hídrico). Todos os ESTs selecionados e tidos como tecido-específicos foram submetidos a análises de Blast no banco do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.br>) visando confirmação da identidade dos mesmos. No caso do EST (CA00-XX-LV5-084-A10-EZ.F) usado na clonagem do polinucleotídeo da presente invenção, análises de tblastx no NCBI indicaram que a sua seqüência deduzida de aminoácidos apresenta 89% de identidade a uma isoflavona redutase (Isoflavone Reductase Related Protein) de *Nicotiana sylvestris*.

Após a fase de seleção *in silico*, a especificidade a um dado tecido foi confirmada por meio da técnica de Transcrição Reversa (RT)-PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos e RNA total extraído de diferentes órgãos/tecidos de café. Para tal, pares de oligonucleotídeos específicos para cada EST identificado no banco foram sintetizados e utilizados nas reações de amplificação. Nesse caso, a seqüência de nucleotídeos do EST (no caso CA00-XX-LV5-084-A10-EZ.F) mais representativo do contig selecionado foi utilizada para desenho dos oligos.

No caso do EST usado na clonagem do polinucleotídeo da presente invenção, os oligos desenhados para a validação via PCR foram: 5' TGAGCCTGCCTCAAGCTTAT 3' (forward) e 5' GACAGACTGTTGGCAGGTGA 3' (reverse).

As reações foram realizadas como descrito a seguir: 0.5 µl de cDNA, 1X PCR

Buffer; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP mix; 1 µM de oligos forward e reverso; e 5 u de Taq DNA polimerase. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 52°C por 40 segundos e polimerização a 72°C por 1 minuto.

5 A região do DNA localizada a montante (5') do EST validado por RT-PCR como apresentando expressão específica em folha (CA00-XX-LV5-084-A10-EZ.F), correspondente portanto à região regulatória do gene em análise, foi amplificada empregando a técnica de *genome walking* (Devic et al. Efficient PCR walking on plant genomic DNA. Plant Physiol Biochem, 35: 1-9, 1997) e DNA genômico extraído de
10 folhas de café. As regiões promotoras putativas foram amplificadas utilizando-se o kit *Universal GenomeWalker* (Clontech; Cat. nº K1807-1), seguindo-se a risca o protocolo fornecido pelo fabricante como sucintamente esquematizado na Figura 1: A) Isolamento de DNA genômico de café; digestão deste com enzimas de restrição *DraI*, *StuI*, *EcoRV* e *PvuII*; ligação dos adaptadores. B) Utilização dos fragmentos de
15 restrição ligados aos adaptadores como molde de amplificação via PCR, empregando os oligonucleotídeos AP e GSP. C) Clonagem dos fragmentos amplificados em vetor pGEM-Teasy e inserção em *E. coli* cepa DH5α.

Para tal, dois oligonucleotídeos gene-específicos reversos (GSP1 5'-CTCCCAAACCTCTTGAAGCTCTCTAGGTTG-3' e GPS2 5'-
20 GCACTTGCCTCCACTACGTATTTGCC-3'), dispostos em sequência, foram sintetizados com base na sequência alvo (EST depositado no banco do Genoma Café - CA00-XX-LV5-084-A10-EZ.F). Esses oligos (GSPs) foram posicionados o mais próximo da região 5' do EST validado e cuja sequência estava disponível no banco.

Para a construção das bibliotecas de *genome walking*, duas alíquotas de DNA
25 genômico de café (20 µg/cada) foram digeridas separadamente com as enzimas de restrição *DraI* e *StuI*, durante 18 horas, sendo a digestão monitorada periodicamente em gel de agarose. Após digestão do DNA genômico com as enzimas descritas, adaptadores foram então ligados à porção terminal dos fragmentos originados para a montagem das bibliotecas, exatamente como recomendado no protocolo descrito no
30 *Universal GenomeWalker Kit User Manual* (Clontech; Protocol PT3042-1) (etapa A da Figura 1). Visando a amplificação das regiões promotoras, alíquotas de DNA das referidas bibliotecas (1ml) foram submetidas a sessões de amplificação por PCR (de

acordo com o protocolo descrito no Universal GenomeWalker Kit User Manual) utilizando-se dos oligos GSP1/GPS2 descritos acima e oligonucleotídeos complementares aos adaptadores fornecidos pelo kit (AP1-5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' e AP2-5'-ACTATAGGGCACGCGTGG-3') (etapa B da Figura 1).

O fragmento único de aproximadamente 1.0 kb amplificado na etapa de *genome walking* (como representado na Figura 1) foi retirado do gel de agarose com auxílio de uma lâmina descartável, e purificado utilizando-se o kit *QIAEX II Gel Extraction* (Quiagen) de acordo com as especificações fornecidas pelo fabricante. O DNA foi eluído da coluna utilizando-se água ultrapura a 70°C.

O produto de amplificação purificado foi em seguida inserido no vetor pGEM® -T Easy (Promega) especificamente usado para inserção de produtos de PCR que possuam um par de nucleotídeos de adenina em suas extremidades (overhang) (etapa C da Figura 1). Aliquotas de aproximadamente 150 ng de DNA foram dispostas em microtubo de 1 ml juntamente com 50% de Tampão de Ligação 2X, 50 ng de vetor e 5 u de T4 DNA ligase. A reação de ligação permaneceu por 16 horas à 14°C. Após esse período, uma alíquota do produto de ligação foi inserida em *Escherichia coli* cepa DH5α por eletroporação como descrito (Sambrook et al. Molecular Cloning, a laboratory manual. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Imediatamente após o pulso (2.200-volts), as células eletroporadas foram ressuspensas em 1 ml de meio Luria-Bertani (LB) líquido (10 g tripton; 5 g extrato de levedura e 10 g NaCl), transferidas para tubo de microcentrifuga de 1.5 ml e mantidas sob agitação constante de 300 rpm a 37°C durante 1 hora. Em seguida, 300 µl da cultura foram plaqueados em placas de Petri contendo meio LB sólido acrescido do antibiótico apropriado, no caso ampicilina (100 mg/l) acrescido de IPTG (24 mg/l) (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) e X-gal (20 mg/l). As placas foram mantidas em estufa a 37°C durante 16 horas.

Foram selecionados três clones de cada evento de transformação para validação quanto à presença do plasmídeo recombinante. Prováveis colônias recombinantes (brancas) foram repicadas em 3 ml de meio LB líquido acrescido de ampicilina (100 mg/l) e incubadas sob agitação constante de 300 rpm a 37°C durante 16 horas. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas e sucessivas minipreparações

de DNA plasmidial foram realizadas, utilizando-se o *QIAGEN Kit Miniprep* (Quiagen), conforme descrito pelo fabricante.

Os plasmídeos foram analisados via padrão de digestão com *EcoRI* e visualização em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. As digestões foram realizadas a 37°C na presença de tampão de reação 1X, 30 ng de DNA plasmidial e água. Confirmada a presença do inserto de tamanho esperado (~1.0 kb), o DNA plasmidial (200 ng) foi submetido a uma reação de seqüenciamento empregando o *BigDye™ Terminator Version 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). Foram seqüenciados 3 clones de cada evento utilizando um equipamento automático modelo ABI PRISM 377 (Applied Biosystems).

As seqüências foram analisadas utilizando-se o programa Chromas 2.30 e um consenso a partir dos três clones seqüenciados foi obtido. Um PCR de validação foi realizado a fim de confirmar a sobreposição das regiões amplificadas em relação aos seus respectivos ESTs. Para tal foi utilizado um oligo *forward* (5'-CAAGATATTGTA-3') desenhado com base nas seqüências promotoras putativas obtidas e os oligos reversos gene-específicos GSP1 e GSP2 descritos anteriormente.

As seqüências obtidas foram submetidas a análises comparativas com seqüências depositadas no banco de dados do NCBI e Genoma Café usando a ferramenta Blastn. Essas análises revelaram a ausência de qualquer identidade ou similaridade significativa com as seqüências depositadas nesses bancos, indicando que a seqüência correspondente ao promotor ***CaIsoR*** identificada na presente patente (SEQ ID NO1) era até então desconhecida. Ao mesmo tempo foram realizadas buscas por motivos regulatórios normalmente presentes em regiões promotoras de genes de plantas utilizando o banco do PLACE database (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>) (Higo et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. Nucleic Acids Research, 27: 297-300, 1999). Os elementos regulatórios encontrados ao longo da seqüência de nucleotídeos da região promotora da presente invenção (TGTCA, W Box, TATA Box, GATA, GARE, MYC, ACE, MRE) estão listados na Figura 2.

Exemplo 3 - Clonagem da seqüência promotora do gene que codifica uma isoflavona redutase de café em vetor de expressão em plantas

O fragmento amplificado (~1.0 kb) contendo o promotor isolado pela técnica de *genome walking*, como descrito anteriormente, foi inserido no vetor pRT103-Gus (Figura 3) (pRT103 modificado; Topfer et al. A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. Nucleic Acids Res., 15:5890, 1987) visando ensaios expressão transiente em café. Para tal, oligonucleotídeos específicos (5'-CCCAAGCTTCACAAACAATTATG-3' e 5'- GATCCCATGGCCAACCTCTAGG-3') foram desenhados e usados na amplificação completa da seqüência regulatória em estudo (*CaIsoR*).

Sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *HindIII* na região 5' e *NcoI* na região 3' (sublinhados acima) foram adicionados aos referidos oligos para viabilizar a inserção do produto amplificado no vetor pRT103-Gus igualmente digerido (reação de digestão: 1 µg de DNA; tampão de enzima diluído para 1X, 1 u de enzima de restrição e água deionizada para um volume final de reação de 20 µl – a reação foi incubada a 37°C por 1h). Nesse caso, uma digestão parcial do referido vetor com a enzima *HindIII* teve que ser realizada uma vez que o mesmo apresenta dois sítios de restrição para tal enzima em sua seqüência de bases. As digestões foram planejadas de maneira a permitir que o promotor 35S presente no vetor pRT103-Gus fosse substituído pela seqüência promotora da presente invenção, sendo a mesma inserida em fusão transcricional com o gene repórter *uidA* (GUS).

As ligações foram realizadas na proporção de 3:1 (inserto : vetor) durante 18 horas a 16°C, sendo os produtos de ligação posteriormente utilizados para transformação de *E. coli* eletrocompetente, cepa DH5α. As transformações foram realizadas em eletroporador (BioRad) como descrito no exemplo 2.

Cinco clones recombinantes foram então repicados e colocados para crescer em meio LB líquido seletivo a 37°C durante 16 horas sob agitação constante (200 rpm). Minipreparações de DNA plasmidial dos clones obtidos e ensaios de digestão com enzimas de restrição foram realizados para confirmar a correta inserção do fragmento promotor no vetor. A seguinte construção foi então obtida: gene quimérico contendo o promotor *CaIsoR* da presente invenção fusionado transcricionalmente ao gene *uidA* (Figura 4).

O gene quimérico descrito acima foi também transferido para o vetor pCAMBIA-1381 (Cambia) (Figura 5) visando os ensaios de transformação estável em

tabaco. Para tal, o conjunto promotor/gene repórter foi liberado do vetor pRT103 por digestão com as enzimas *Hind*III e *Nco*I (vide reação de digestão descrita anteriormente) e inserido no vetor de expressão de plantas pCAMBIA-1381 igualmente digerido.

5 As ligações foram realizadas na proporção de 3:1 (inserto:vetor) durante 18 horas a 16°C, sendo os produtos de ligação posteriormente utilizados para transformação de *E. coli* eletrocompetente, cepa DH5α (vide exemplo 2). As bactérias foram então plaqueadas em meio LB seletivo contendo antibiótico apropriado (canamicina 100 µg/ml) e incubadas em estufa a 37°C durante 18 horas.

10 Três clones foram repicados em meio LB líquido seletivo e colocados para crescer a 37°C durante 16 horas sob agitação constante (200 rpm). Após a obtenção do DNA plasmidial através de miniprep empregando o *QIAGEN Kit Miniprep* (Quiagen), estes foram seqüenciados em seqüenciador automático como descrito anteriormente, visando confirmar a correta inserção do promotor no vetor.

15 Exemplo 4 - Expressão transiente em folha de *Coffea arabica* via biobalística

Para os ensaios de biobalística foi utilizado o gene quimérico obtido no exemplo 3 e como controle positivo o vetor pRT103-Gus fechado, isto é, contendo o gene repórter *uidA* sob controle do promotor 35S. Os tratamentos usados no ensaio foram:

20 Gene quimérico 1 – Promotor 35S + gene repórter GUS (Controle positivo; Figura 3)

Gene quimérico 2 - Promotor *CaIsoR* da presente invenção + gene repórter GUS (Figura 4)

25 As versões dos genes quiméricos acima descritas foram bombardeadas tanto na região hipocotiledonar como na hepocotiledonar de plântulas de *C. arabica* adotando os procedimentos descritos no protocolo do Manual de Transformação Genética de Plantas, produzido pela Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas, com algumas modificações. Nesse caso, foram realizados 8 disparos por planta, sendo quatro na região hipocotiledonar (pressão de 1100 psi), dois disparos de cada lado da plântula e

quatro na região hepícotiledonar (pressão de 600 psi), sendo repetida as inversões.

Após os ensaios de biobalística, o material vegetal foi mantido em papel de germinação umedecido com água Milli-Q em câmara de crescimento a 30°C durante 48 horas, tempo após o qual foi iniciado o ensaio enzimático de revelação da atividade GUS.

Para tal, o material bombardeado foi submerso em solução de 50 mM de fosfato de sódio pH 7.5, 10 mM Na₂EDTA, 0.1% Sarcosil, 0.1% Triton X-100, 5 mM Ferrocianato de potássio, 5 mM Ferrocianeto de potássio, 10 mM β-mercaptoetanol e 1 mM do substrato X-Gluc. As amostras foram mantidas no escuro a temperatura de 30°C durante 16 horas. Após esse período o material foi lavado com etanol 70%, visando o bloqueio da atividade GUS e a completa retirada da clorofila, e então fixado em glicerol 50%.

O anexo 1 mostra a expressão transiente do gene repórter GUS em folha de *Coffea arabica* transformada via biobalística com o gene quimérico contendo o promotor **CalsoR**. A detecção da atividade do gene repórter GUS (pontos azuis) em folhas transformadas via biobalística revela que a região isolada via *genome walking* apresenta atividade transcricional específica e restrita a esse órgão. A confirmação da transformação pontual das células epidermais por análise de microscopia óptica também pode ser vista no anexo 1 (A, B, C, D e E). Análises mais detalhadas revelam também a presença de um grande número de estômatos transformados nessas folhas (B, C). Nesse ensaio foram utilizadas partículas de ouro BioRad 1.0 micron sob pressão de disparo de 1100 psi (F).

Exemplo 5 - Obtenção de plantas transgênicas de tabaco contendo o promotor **Ca IsoR**

Clones de *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 transformadas com o gene quimérico contendo o promotor **CalsoR** foram incubadas em 5 ml de meio YEP líquido seletivo (10 g Triptona; 10 g Extrato de Levedura; 10 g NaCl contendo 100 µg/ml de canamicina e 100 µg de rifampicina) com agitação entre 100-150 rpm a 28°C, até atingirem uma absorbância (600 nm) entre 0.5 e 1. Posteriormente, 1 ml desse inoculo foi transferido para um tubo de centrifuga de 50 ml, ao qual foi

adicionado 4 ml de meio YEP líquido. Tais amostras foram mantidas à temperatura ambiente até a utilização.

Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) cultivadas *in vitro* foram utilizadas no processo de transformação. Discos foliares de 1 cm² foram retirados com auxílio de um vazador de ferro previamente esterilizado, e mantidos em placa de Petri até o processo de transformação. Para a transformação foram utilizadas cinco placas de Petri com dez discos foliares cada. Os discos foram imersos por 15 minutos no meio YEP contendo as agrobactérias sendo posteriormente secos em papel de filtro estéril e então transferidos para placas contendo meio MS sólido (Murashige, T. e Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497, 1962). Essas placas foram mantidas no escuro durante 48 horas em sala de crescimento a 28°C. Após esse período, os discos foram transferidos para placas de Petri contendo meio MS sólido adicionado de 100 µg/ml de higromicina, 500 µg/ml de cefotaxima, 1 µg/ml de 6-benzilaminopurina (BAP) e 100 µg/ml ácido naftalenoacético (ANA). As placas foram mantidas por aproximadamente 30 dias em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz até o surgimento de calos. Como controle positivo foram utilizados discos foliares não transformados mantidos no meio seletivo acima citado. Posteriormente as pequenas plântulas formadas a partir desses calos foram individualizadas em potes de vidro contendo meio de enraizamento (meio MS descrito acima, porém desprovido do hormônio 6-benzilaminopurina) para indução da formação de raízes.

Foram regeneradas 17 plantas transformadas com gene quimérico contendo o promotor específico de folha fusionado ao gene repórter GUS. A fim de confirmar a inserção do gene quimérico, DNA genômico dessas plantas foi extraído a partir de tecido foliar utilizando protocolo previamente descrito (Konieczny, A. e Ausubel, F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.*, 4:403-410, 1993).

A inserção do gene quimérico nas plantas regeneradas foi confirmada em reações de PCR empregando 2 µl de DNA genômico em tampão de reação 1X, adicionado de 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1 µM de cada oligonucleotídeo [um específico do promotor (5'-CAAGATATTGTA-3') e outro complementar ao gene GUS (5'-GTCTGCCAGTTCAGTTCGTTGTTC-3')], e 5 u de Taq DNA

polimerase (Invitrogen). As plantas tidas como positivas na reação de PCR, que apresentavam, portanto, o fragmento de tamanho esperado (~1.0 kb) correspondente ao promotor da presente invenção mais gene GUS, foram submetidas a ensaio histoquímico de GUS como descrito no exemplo 4.

5 Para a realização dos ensaios de expressão do gene repórter em resposta ao estresse abiótico (lesão mecânica), foram escolhidas aleatoriamente cinco plantas da geração F1 de cinco diferentes eventos de transformação, todas positivas nas análises de PCR e nos ensaios histoquímicos de GUS (sendo amostrado portanto um total de vinte e cinco plantas). Para tal, plântulas de aproximadamente 45 d.a.g (dias após
10 germinação) tiveram parte de suas folhas lesionadas, com auxílio de uma pinça estéril e 4 horas após tratamento, as mesmas foram submetidas a ensaio histoquímico de GUS como descrito no exemplo anterior.

 O anexo 2 revela a atividade da β -glucuronidase em folhas de tabacos transgênicos transformados com o gene quimérico contendo o promotor *CaIsoR*
15 submetidas ao dano mecânico. O painel A mostra a planta selvagem lesionada, onde não há detecção da atividade do gene repórter. Os painéis B, C, D, E e F representam o padrão de expressão de GUS observado em todas as plantas transgênicas submetidas ao estresse por dano mecânico. Nesse caso é possível constatar que a lesão mecânica é capaz de ativar uma resposta de expressão temporal e localizada do gene repórter,
20 confirmando que o promotor da presente invenção, além de apresentar expressão específica em folha, é também induzido por estresse abiótico.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

1) INFORMAÇÕES GERAIS:

I.a) Requerente: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

I.b) Endereço: Parque Estação Biológica – Av. W3 Norte – final CEP 70770-901.
5 Brasília/DF - Brasil

II) Título da Invenção: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA DIRECIONAR A EXPRESSÃO DE GENES USANDO O PROMOTOR DO GENE DA FAMÍLIA DAS ISOFLAVONAS DE PLANTAS DE CAFÉ

III) Número de Sequências: 01 (uma).

10 IV) Formato para leitura em computador:

IV.a) Meio utilizado: disquete de 3,5 polegadas.

IV.b) Computador utilizado: compatível com IBM PC.

IV.c) Sistema operacional: PC-DOS/MS-DOS (FastSEQ for Windows Version 4.0 – software usado para criar Lista de Sequências).

15 2) INFORMAÇÕES GERAIS DAS SEQUÊNCIAS:

I) Número identificador da sequência: SEQ ID No: 1

II) Características da sequência:

II.a) tamanho: 946 pares de base

II.b) tipo: ácido nucleico

20 II.c) Conformação: filamento único

II.d) Topologia: linear

III) Característica da molécula seqüenciada

III.a) Nome: isoflavona redutase.

25 II.b) Produto do gene: promotor derivado do gene da família da isoflavona redutase de plantas de café (*Coffea arabica*).

IV) Outras informações relevantes:

IV.a) Família: isoflavona

IV b) Organismo: *Coffea arabica*

V) Sequência:

	AAAAAAAAATT CACAAACAAT TATGAGAAAT TGTTAAAAGG AGTAAATTGA	50
	TTTGATATTA TCATGATCGT TGATCCAAAG GTTCATAGCA TTTGGTAACT	100
	TCAGTTGATT TCTTTTTTGT TTTCCATTGG GCAACCATGT CATGTCCAGC	150
5	TAATTTCTGA CCTTACAAGA TAATACTAAT TTCTGACCTT ACAATATATT	200
	ATCTTACTAG ATAATTTCTG ACCTTACCTT AGAAGATATT ATCTTACTAG	250
	ATAATTTCTG ACCTTAATTC TAATTTCTAA CCTTACAAGA TATTATCTTA	300
	CAAGATAATT TCTGACCTTA CATGACCTTA CAAGATATTG TGAGAACCAA	350
	GAATCGAAAG TTGAATGTGA CTTTTTTTTGT TTTTTCCTTT CAAATATTTG	400
10	ATGACATGTG CAATTGCGCA TGCTTGCCAT TATTTTTTTTT AAGAAAAAAG	450
	TTTGGGCGCT CAGTTTGATC TCGACCATAC ATATCTAGGA TTGACCATAC	500
	GTTGCTTACA AGGTTTCTAT AGATCACCTA CCAATACAGT TATTATATTG	550
	ATAGCAAAAT TTGAACATGT AACTCTTGGT AAGGAAGTGA TCGTCTTTAT	600
	CAACTGAACC AACTTATGTT GACATTTGCC GATAAGAATC CATAGAGTAC	650
15	GAAGATTAAT CCTTGAGCA TTTTAGAAAT TTTAGAGGCC AATAGAGCAT	700
	CAAAAGGAAA CGGCAGCGAC AGGGCTATCA TTTTCAATAT TTTTTCCTCT	750
	ATAAATTAAT CTTGCACGGA GCTGCAGCCT ATGGTCACTA AGCACATTCT	800
	GCATCTCTTC AACTCATCAA ATTACAGATT GTATCCAATT TGCAACAGTA	850
	GTTTACCATC CTAGAGTTGG AAATGGCTGT GAAAAGCAAG ATTTTGATCA	900
20	TTGGCGGCAC CGGATACATT GGCAAATACG TAGTGGAGGC AAGTGC	946

REIVINDICAÇÕES

1. Um polinucleotídeo com atividade tecido-específica caracterizado por compreender uma sequência selecionada dentre o grupo consistindo de:
 - a) sequências que possuam pelo menos 40% ou 45% de identidade de sequência, preferencialmente cerca de pelo menos 50% ou 55% de identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de pelo menos 60% ou 65% de identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de pelo menos 70% ou 75% de identidade de sequência, mais preferencialmente ainda cerca de pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência quando comparada com a SEQ ID NO1;
 - b) complementos da sequência descrita em SEQ ID NO1;
 - c) complementos reversos da sequência descrita em SEQ ID NO1;
 - d) sequências reversas da sequência descrita em SEQ ID NO1.
2. Um polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato da atividade tecido-específica ser na folha.
3. Um gene quimérico caracterizado por compreender:
 - a) um polinucleotídeo cuja sequência possua pelo menos 40% ou 45% de identidade de sequência, preferencialmente cerca de pelo menos 50% ou 55% de identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de pelo menos 60% ou 65% de identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de pelo menos 70% ou 75% de identidade de sequência, mais preferencialmente ainda cerca de pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência quando comparada com a SEQ ID NO1, opcionalmente ligado a sequências acentuadoras de expressão ou promotores de interesse; operacionalmente ligados a
 - b) uma sequência de polinucleotídeo de interesse.
4. Um gene quimérico de acordo com a reivindicação 3 caracterizado pelo fato da sequência de polinucleotídeo de interesse poder ser uma região de codificação ou uma região de não codificação.

5. Um gene quimérico de acordo com a reivindicação 4 caracterizado pelo fato da região de codificação ser isolada de um gene endógeno ou heterólogo.
6. Um gene quimérico de acordo com a reivindicação 3 caracterizado pelo fato da sequência de polinucleotídeo de interesse poder estar na orientação sense ou antisense.
7. Um gene quimérico de acordo com a reivindicação 3 caracterizado pelo fato das sequências acentuadoras de expressão serem selecionadas do grupo consistindo de SV40, HSV-1, AMV, HPV-16 , entre outros.
8. Um vetor recombinante caracterizado por conter um gene quimérico de acordo com a reivindicação 3.
9. Um vetor recombinante caracterizado por compreender:
 - a) um polinucleotídeo cuja sequência possua pelo menos 40% ou 45% de identidade de sequência, preferencialmente cerca de pelo menos 50% ou 55% de identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de pelo menos 60% ou 65% de identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de pelo menos 70% ou 75% de identidade de sequência, mais preferencialmente ainda cerca de pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência quando comparada com a SEQ ID NO1, opcionalmente ligado a sequências acentuadoras de expressão ou promotores de interesse; operacionalmente ligados a
 - b) uma sequência de polinucleotídeo de interesse; e
 - c) uma sequência de terminação.
10. Um vetor recombinante de acordo com a reivindicação 9 caracterizado pelo fato da sequência de polinucleotídeo de interesse poder ser uma região de codificação ou uma região de não codificação.
11. Um vetor recombinante de acordo com a reivindicação 9 caracterizado pelo fato da sequência de polinucleotídeo de interesse ser isolada de um gene endógeno ou heterólogo.
12. Um vetor recombinante de acordo com a reivindicação 9 caracterizado pelo fato da sequência de terminação ser selecionada do grupo consistindo de sinal de terminação de SV40, sinal de adenilação de HSV TK, sinal de terminação do

gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* (NOS), sinal de terminação do gene da octopina sintetase, sinal de terminação do gene 19S e 35S do CaMV, sinal de terminação do gene da álcool desidrogenase de milho, sinal de terminação do gene da manopina sintetase, sinal de terminação do gene da beta-faseolina, sinal de terminação do gene da ssRUBISCO, sinal de terminação do gene da sucrose sintetase, sinal de terminação do vírus que ataca o *Trifolium subterranean* (SCSV), sinal de terminação do gene trpC de *Aspergillus nidulans* e outros semelhantes.

- 5 13. Um vetor recombinante de acordo com a reivindicação 9 caracterizado pelo fato
10 das seqüências acentuadoras de expressão serem selecionadas do grupo
consistindo de SV40, HSV-1, AMV, HPV-16 , entre outros.
14. Uma célula transformada caracterizada pelo fato de conter um vetor
recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 13.
- 15 15. Uma planta, ou uma parte, ou um propágulo ou progênie da mesma
15 caracterizada por compreender um vetor recombinante de acordo com qualquer
uma das reivindicações 8 a 13.
16. Método para modificar a expressão de genes em um organismo caracterizado
por incorporar estavelmente no genoma do organismo um vetor recombinante de
acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 13 ou um gene quimérico de
20 acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 7.
17. Método de acordo com reivindicação 16 caracterizado pelo fato do organismo
ser uma planta.
18. Método para produzir uma planta tendo a expressão de um gene modificada
caracterizada pelo fato de compreender as seguintes etapas:
25 a) transformar uma célula de planta, tecido, órgão ou embrião um vetor
recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 13 ou
um gene quimérico de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a
7;
b) selecionar células transformadas, calos de células, embriões ou sementes;
30 c) regenerar plantas maduras de células transformadas, calos de células,
embriões ou sementes selecionados na etapa (b);

- d) selecionar plantas maduras da etapa (c) tendo a expressão do gene modificada quando comparada com uma planta não transformada.

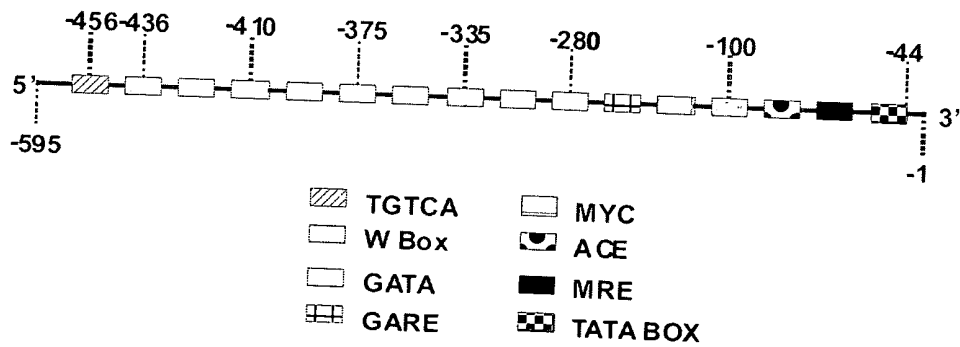
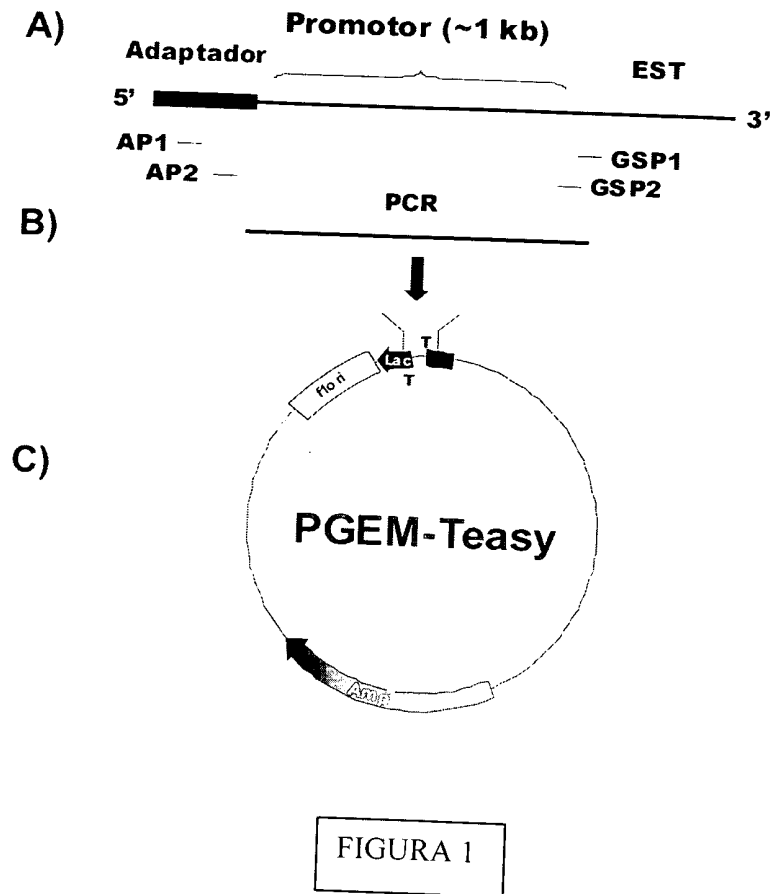


FIGURA 2

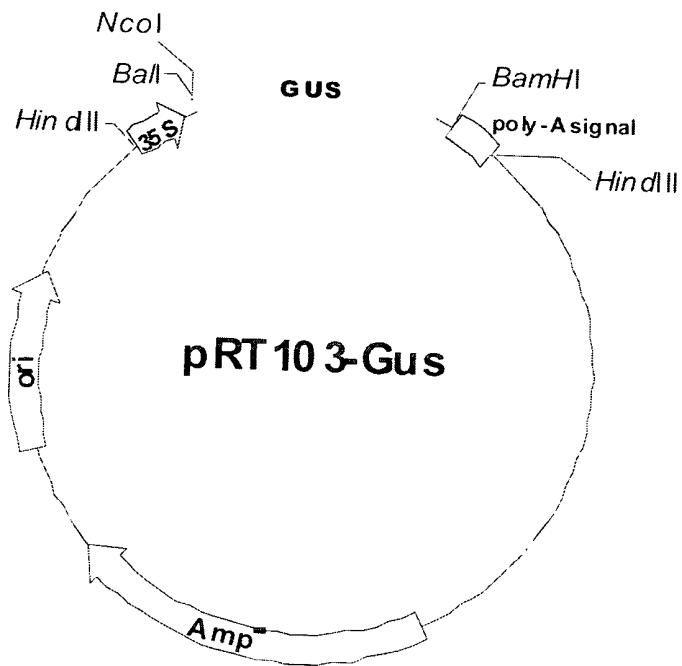


FIGURA 3

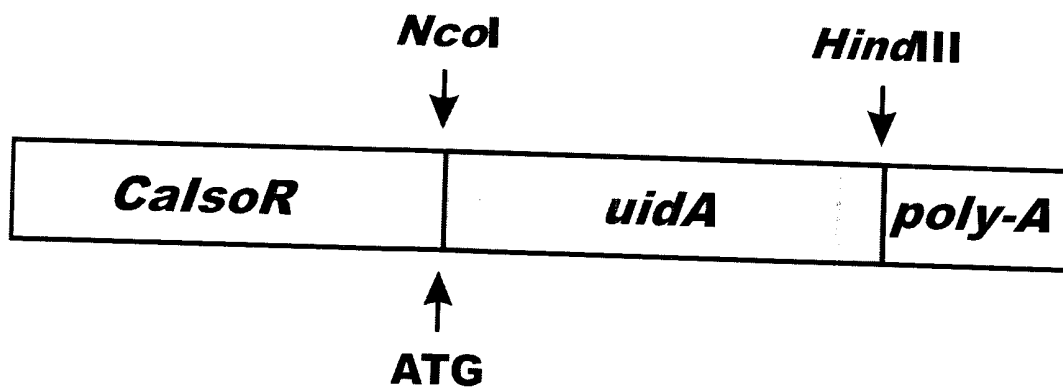


FIGURA 4

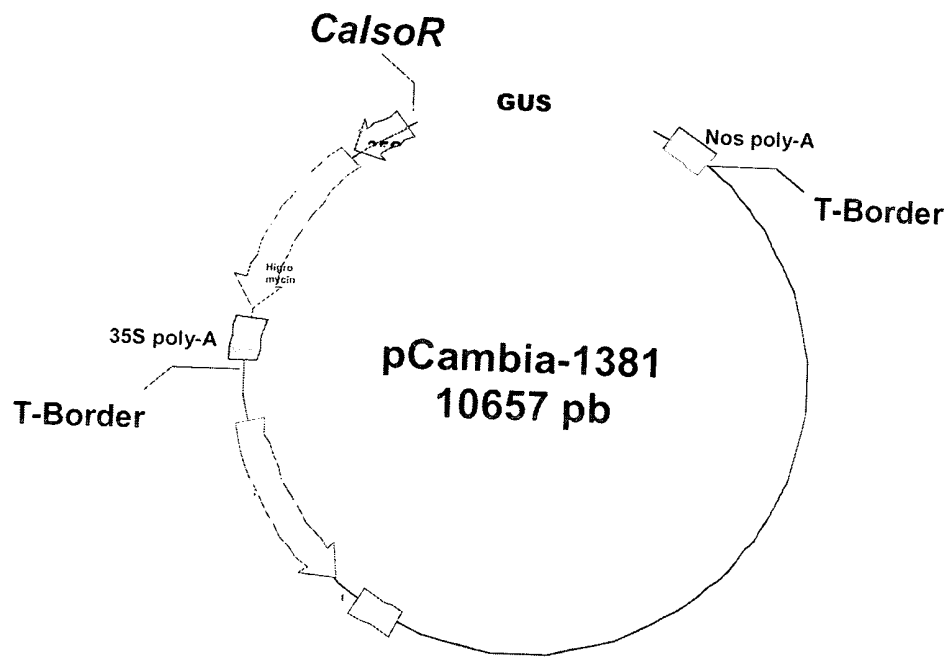
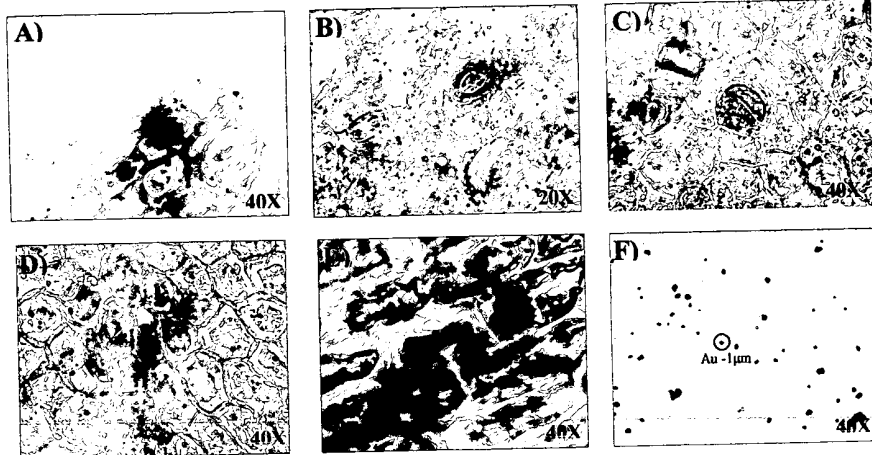


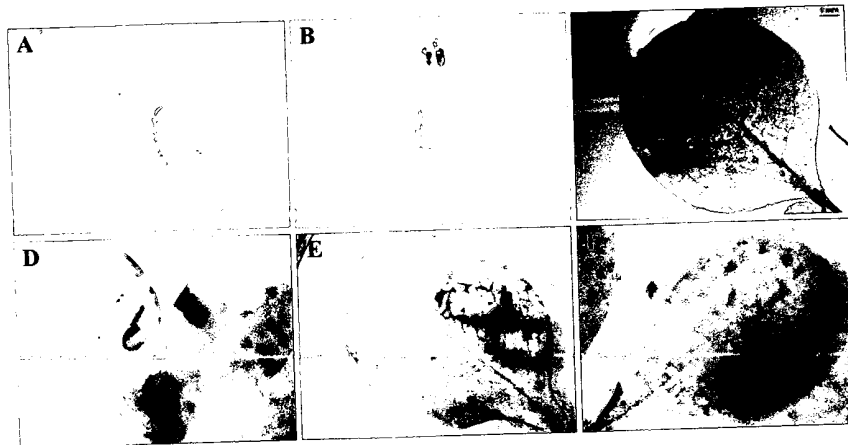
FIGURA 5

RESUMO**COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA DIRECIONAR A EXPRESSÃO DE GENES USANDO O PROMOTOR DO GENE DA FAMÍLIA DAS ISOFLAVONAS DE PLANTAS DE CAFÉ**

5 A presente invenção compreende a descrição de uma nova seqüência regulatória provida para direcionar a expressão de uma seqüência de nucleotídeo, tal como genes estruturais, em folhas de plantas, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas. Mais especificamente a invenção refere-se a seqüências regulatórias de polinucleotídeos isoladas de plantas de café que são capazes de iniciar e acionar a transcrição de polinucleotídeos, e
10 ao uso destas seqüências regulatórias no direcionamento de transcrição de polinucleotídeos endógenos e/ou heterólogos para tecidos foliares e produção de polipeptídeos. A invenção descreve ainda construções de DNA que contém o promotor do gene da família das isoflavonas de plantas de café que está operacionalmente ligado a um gene heterólogo e/ou endógeno. Além disso, a invenção diz respeito ao uso destas construções na forma de
15 vetores de expressão, vetores recombinantes e em plantas, células vegetais ou protoplastos transgênicos. A invenção ainda descreve um método utilizando tais construções contendo o promotor do gene da família das isoflavonas de plantas de café para produção de plantas, células vegetais ou protoplastos transgênicos.



ANEXO 1



ANEXO 2