



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

(21) PI 0809008-4 A2



* B R P I 0 8 0 9 0 0 8 A 2 *

(22) Data de Depósito: 11/03/2008

(43) Data da Publicação: 16/09/2014
(RPI 2280)

(51) Int.Cl.:

A01H 5/00

C12N 5/04

C12N 15/29

C12N 15/82

C07K 14/415

(54) Título: MELHORIA DO DESEMPENHO DE PLANTAS TOLERANTES AO FRIO E A SAIS COM O GENE SNAC2 DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO DO ARROZ

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 12/03/2007 CN 2007 10051654.7

(73) Titular(es): Huazhong Agricultural University

(72) Inventor(es): Honghong Hu, Lizhong Xiong

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT CN2008000483 de 11/03/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/110073de 18/09/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MELHORIA DO DESEMPENHO DE PLANTAS TOLERANTES AO FRIO E A SAIS COM O GENE SNAC2 DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO DO ARROZ".

Campo Técnico

5 A presente invenção refere-se ao campo da biotecnologia de plantas e, mais particularmente, ao isolamento de clones, à confirmação da função e ao uso de um fragmento de DNA (gene) do arroz. O dito gene está associado com a tolerância da planta ao estresse causado pelo frio e por sais. O desempenho de tolerância ao frio e a sais de uma planta transgênica
10 é notavelmente melhorado através da transferência de uma região de tradução completa (Sequência codificadora) do gene ligado a um promotor forte (Ubiquitin1) do milho a uma planta.

Técnica Antecedente

15 O crescimento de plantas é naturalmente sujeito à influência do ambiente. Por exemplo, a seca, os danos causados por sais e a baixa temperatura sempre levam à grande redução da produção das plantas de cultivo, atribuindo assim um desafio ao desenvolvimento da agricultura em muitas áreas. Para lidar com ou para se adaptar ao efeito adverso do ambiente, as plantas percebem as alterações das condições ambientais extracelulares
20 e sinalizam as células através de várias vias. Em resposta, as células induzem a expressão de alguns genes que respondem para gerar algumas proteínas funcionais, substâncias de osmorregulação e fatores de transcrição para a transmissão de sinais e para a regulação da expressão gênica, dos quais todos protegem as células dos danos causados por estresse de seca,
25 alta salinidade, temperatura baixa e similares, de forma que as plantas são capazes de produzir respostas correspondentes para alterações ambientais (Xiong e outros, Cell signaling during cold, drought and salt stress. Plant Cell. 14 (supl), S165-S183, 2002). O fato destes genes funcionais poderem ser expressos de forma apropriada durante uma resposta a um estímulo ambiental é precisamente regulado por fatores de regulação, particularmente,
30 fatores de transcrição. Foi descoberto atualmente que a expressão de membros de famílias de fatores de transcrição tais como AP2/EREBP, Dedo de

Zinco, Myb, bZIP e NAC pode ser induzida ou inibida sob estresses ambientais diferentes. Portanto, foi considerado que estes desempenham uma função muito importante na regulação e no controle da resposta de uma planta ao estresse ambiental. Além disso, o isolamento e a identificação dos fatores de transcrição, que desempenham uma função crítica na regulação e no controle e podem ser aplicados para melhorar plantas de cultivo resistentes ao estresse, têm uma enorme contribuição para a produção de plantas de cultivo. Atualmente, foram feitas tentativas para aumentar o desempenho das plantas durante o estresse. Por exemplo, plantas transgênicas de *Arabidopsis* que superexpressam DREB1A exibem maior tolerância à temperatura baixa e à seca que as plantas do tipo selvagem (Liu Q e outros, "Two transcription factors, DREB1 e DREB2, with an EREBP/AP2 DNA domains separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*." *Plant Cell*. 1998, 10: 1391-1406). O grupo de pesquisa de Thomashow na Michigan State University (U.S.A.) também cultivou plantas com maior tolerância ao frio através da transformação genética com o gene *CBF1* de *Arabidopsis*.

O arroz é uma das plantas de cultivo alimentares mais importantes. O arroz com maior desempenho de tolerância ao frio e a saiz possui significância importante para o ser humano. Portanto, existe uma necessidade urgente para descobrir fatores de transcrição associados ao desempenho de tolerância ao frio e a saiz de forma a cultivar variedades melhoradas tolerantes ao frio e à refrigeração.

Sumário da Invenção

Um objetivo da presente invenção é isolar um fragmento de DNA que contém segmentos codificadores completos de um gene de fator de transcrição associado à tolerância do arroz ao frio e a saiz, cloná-lo, e utilizar o gene para aumentar a tolerância ao estresse do arroz e de outras plantas. Uma análise estrutural deste gene mostrou que este pertence à família dos fatores de transcrição NAC específica à planta e refere-se ao estresse, tal como o chamado *SNAC2*.

A presente invenção refere-se ao isolamento e ao uso de um

fragmento de DNA que contém o gene *SNAC2*, que confere à planta maior capacidade de tolerância em condições de estresse tal como temperatura baixa e similar. O dito fragmento de DNA é, por exemplo, mostrado na SEQ ID NO: 1, a sequência de DNA altamente homóloga substancialmente equivalente à SEQ ID NO: 1 ou o subfragmento de sequência mostrado na SEQ ID NO: 1 que possui substancialmente a mesma função.

Um gene da presente invenção ou um gene homólogo do mesmo pode ser obtido através da verificação de uma biblioteca de cDNA ou de DNA genômico com um gene *SNAC2* clonado utilizado como uma sonda. O gene *SNAC2* da presente invenção e quaisquer segmentos de DNA de interesse ou segmentos de DNA homólogos dos mesmos também podem ser obtidos através da amplificação do DNA genômico, do mRNA e do cDNA utilizando a tecnologia da PCR (reação em cadeia da polimerase). Dessa maneira, pode ser isolada uma sequência que contém o gene *NAC2*. Através da transformação de plantas com a dita sequência isolada em qualquer vetor de expressão que pode direcionar a expressão de um gene exógeno em planta, podem ser produzidas plantas transgênicas com maior tolerância a estresses de baixa temperatura e salinidade alta. De acordo com a presente invenção, no processo de construção do gene do presente pedido de patente dentro do vetor de expressão da planta, qualquer promotor forte ou promotor que pode ser induzido pode ser adicionado na posição que precede o nucleotídeo de início da transcrição ou alternativamente, pode ser utilizado um intensificador. Tal região intensificadora pode ser o código de início ATG e o código de início de regiões contíguas e similares, contanto que a região intensificadora esteja no mesmo quadro que a sequência codificadora para garantir a tradução de uma sequência completa.

O vetor de expressão que carrega um gene *SNAC2* da presente invenção pode ser introduzido em células vegetais através de técnicas de biotecnologia convencionais tais como plasmídeo Ti, vetor viral de planta, transformação de DNA direta, microinjeção, eletroporação e similares (Weissbach, 1998, Method for Plant Molecular Biology VIII, Academy Press, Nova York, pp. 411-463; Geiserson e Corey, 1998, Plant Molecular Biology

(2ª Edição)).

O vetor de expressão que contém um gene *SNAC2* da presente invenção pode ser utilizado para transformar um hospedeiro, que é uma ampla variedade de plantas incluindo o arroz, para cultivar variedades de plantas que possuem excelente resistência a sais e ao frio.

O gene da presente invenção é expresso através da indução do estresse e, portanto, seu promotor é um promotor do tipo que pode ser induzido. Através da inserção de um segmento promotor da presente invenção e qualquer gene de interesse em um vetor de expressão apropriado e da transformação de um hospedeiro vegetal, é possível induzir a expressão do gene sob condições de estresse, melhorando assim o desempenho de tolerância das plantas em resposta ao estresse.

A presente invenção será demonstrada adicionalmente de acordo com o que é descrito a seguir em associação às modalidades específicas.

Breve Descrição das Figuras

A SEQ ID No: 1 na Listagem de Sequências mostra a sequência do fragmento de DNA isolado e clonado de acordo com a presente invenção, que compreende a região que codifica o gene *SNAC2*.

A figura 1 mostra um fluxograma do isolamento e da identificação do gene *SNAC2*.

A figura 2 mostra o nível de expressão do gene *SNAC2* medido através da hibridização por Northern em pontos de tempo diferentes sob estresses diferentes incluindo seca, sal, frio e ABA.

A figura 3 mostra a expressão do gene *SNAC2* em plantas transgênicas, em que com a primeira faixa está o controle e o resto são plantas transgênicas independentes transgenicamente.

A figura 4 mostra o crescimento de famílias transgênicas que superexpressam *SNAC2* no estágio de muda na fase de recuperação após a submissão ao estresse de temperatura baixa, em que a metade de cada balde vermelho pequeno é plantada com os controles, a outra metade é plantada com plantas transgênicas. O estresse de temperatura baixa refere-

se a uma condição em que a planta é submetida a 12 h de luz/12 h de escuridão em uma incubadora a 4°C durante 5 dias, seguidos pela recuperação do crescimento sob condições normais.

5 A figura 5 mostra o crescimento de famílias transgênicas que superexpressam *SNAC2* no estágio de muda em salinidade alta, em que a figura 5A é uma fotografia tirada das mudas que germinaram durante 4 dias antes de serem transplantadas para um meio MS contendo 150 mM de NaCl onde cresceram durante 18 dias e a figura 5B mostra os resultados estatísticos em relação ao peso e ao comprimento das raízes das plantas (B).

10 A figura 6 ilustra um ensaio de transativação em levedura e um ensaio de híbrido isolado de levedura que demonstram que o *SNAC2* possui características de ativação da transcrição e de ligação ao DNA, em que a figura 6A é o ensaio de transativação; a figura 6B é o ensaio de híbrido isolado de levedura.

15 A figura 7 ilustra uma localização subcelular do gene *SNAC2* nas células vegetais. A figura 7A é um diagrama esquemático de um vetor construído; a figura 7B é constituída das inspeções visuais com microscopia confocal, dentre as quais a figura 7B(i) é uma observação da seção de calo corada com o corante fluorescente iodeto de propídio, a figura 7B(ii) é uma
20 imagem da expressão de GFP sob fluorescência verde, a figura 7B(iii) é o resultado combinado das fluorescências vermelha e verde.

A Figura 8 ilustra o vetor PU1301.

A Figura 9 ilustra o vetor pCAMBIA1391-EGFP.

Exemplos

25 No estágio inicial da presente invenção foi obtido o clone de cDNA 99C10 derivado da variedade de arroz MingHui 63 (uma variedade de arroz que é amplamente cultivada na China). Este cDNA na forma que é obtido é um cDNA de comprimento completo do gene *SNAC2*, que é um fator de transcrição associado com a resistência à seca. São mostradas a seguir
30 as razões pelas quais este cDNA foi utilizado: (1) foi observado após uma análise utilizando uma técnica de chip de cDNA que a quantidade de expressão do clone de cDNA 99C10 na variedade de arroz "ZhongHan 5" (uma

variedade de arroz disponível publicamente fornecida pela Shanghai Academy of Agricultural Sciences, China) era aumentada em 3,5 vezes após um tratamento de estresse de seca durante 15 dias. Os resultados do sequenciamento indicavam que o gene era OsNAC6 (número de acesso AK068392).

- 5 Em vista da diferença significativa na quantidade de expressão do clone após o tratamento para seca e suas características funcionais, foi considerado que o gene representado pelo clone 99C10 estava envolvido na regulação e no controle da expressão do gene sob estresses; (2) de acordo com a análise do perfil de expressão do gene sob estresse (ver a figura 2), foi observado que o nível de expressão do gene era notavelmente maior durante os
- 10 tratamentos para estresse; (3) as plantas transgênicas com superexpressão do gene de comprimento completo possuem tolerância significativamente maior ao frio e à salinidade alta (ver as figuras 4 e 5). Tudo isso mostra que o gene *SNAC2* é um gene associado ao estresse envolvido na regulação e
- 15 no controle da resistência não somente à seca, mas também à salinidade alta e ao frio.

A presente invenção se tornará mais evidente com as descrições dos exemplos a seguir, que estão relacionados com aos métodos para o isolamento e para a clonagem do fragmento de DNA que compreende a região

20 codificadora completa do gene *SNAC2* e para a verificação da função do gene *SNAC2* com base nos resultados anteriores no estágio inicial da presente invenção (fluxograma destes métodos como mostrado na figura 1). Partindo da descrição e dos exemplos a seguir, um perito na arte pode determinar as características básicas da presente invenção e considerar que

25 quaisquer alterações e modificações podem ser feitas adicionalmente na presente invenção para a adaptação aos vários usos e condições sem se afastar do espírito e do âmbito da presente invenção.

Exemplo 1: Isolamento e Clonagem do Fragmento de DNA que Contém o Segmento do Gene *SNAC2*

- 30 Os iniciadores do gene F
(5-TAGAATTTCGACGAGGAGCTGGTGATGC-3,
SEQ ID NO: 5, iniciador específico mais o sítio de clivagem enzimática *Eco*-

RI) e

R (5-TAGGATCCCCTCGTCGTCGTTTCAGTCC-3,

SEQ ID NO: 6, iniciador específico mais o sítio de clivagem enzimática *Bam*
HI) foram planejados de acordo com o quadro aberto de leitura do vetor
 5 pGAD-Rec2 com base na sequência do clone de cDNA de comprimento
 completo. Os produtos da PCR obtidos foram digeridos duplamente, purifi-
 cados com clorofórmio:isopentanol e ligados ao vetor pGAD-Rec2 submetido
 à mesma digestão dupla. A *E. coli* DH10 β (obtida na Invitrogen Inc.) foi
 transformada e os clones positivos foram selecionados e verificados com o
 10 mesmo método de digestão enzimática, produzindo o vetor de transforma-
 ção de levedura pGAD-SNAC2.

Exemplo 2: Detecção da Expressão que Pode ser Induzida do Gene SNAC2
 Endógeno do Arroz

A variedade de arroz "Zhonghan 5" como uma matéria-prima foi
 15 tratada separadamente sob estresse causado por seca, frio e alta salinidade
 assim como ABA no estágio de 3 folhas. O tratamento de seca foi realizado
 através da imersão da raiz da muda em 20% de polietileno glicol (de nome
 comercial PEG6000) durante 0h, 0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h, antes da amostragem.
 O tratamento com frio foi realizado colocando a muda em uma incubadora a
 20 4°C durante 0h, 1h, 8h, 12h, antes da amostragem. O estresse causado por
 alta salinidade foi realizado através da imersão da raiz da muda em 200
 mM/L de solução de NaCl durante 0h, 4h, 8h, 16h, antes da amostragem. O
 tratamento com ABA foi realizado através da imersão da raiz da muda em
 100 μ M/L de solução de ABA durante 0h, 0,5h, 3h, 6h, 12h, 24h antes da
 25 amostragem. Os RNAs totais das folhas foram extraídos (utilizando o rea-
 gente Trizol, Invitrogen), então submetidos à transferência em membrana do
 RNA (de acordo com os métodos experimentais de "Molecular Cloning", Sci-
 ence Press, Peking, 1999) e finalmente um híbrido de Northern com SNAC2
 foi utilizado como uma sonda. O resultado mostrou que a expressão do gene
 30 SNAC2 clonado na presente invenção pode ser induzida pela seca, pelo frio,
 pela alta salinidade e pelo ABA (mostrado como na figura 2), portanto consi-
 derado um fator de transcrição associado ao estresse.

Exemplo 3: Construção e transformação do vetor de superexpressão do gene *SNAC2*

O Exemplo 2 anterior mostrou que a expressão do gene *SNAC2* da presente invenção pode ser induzida pela seca, pelo frio, pela alta salinidade e pelo ABA. Para ilustrar melhor a função deste gene, o gene *SNAC2* foi superexpresso no arroz e verificado através do fenótipo de plantas transgênicas. O processo compreende as etapas a seguir de: digestão dupla do plasmídeo pGEM-*SNAC2* com o clone positivo obtido no Exemplo 1 com *Bam*HI e *Kpn*II; recuperação de fragmentos exógenos; ao mesmo tempo, clivagem enzimática do vetor de transformação genética pU1301 com o promotor forte do milho Ubiquitin1 (que é reconstruído com base em um vetor de transformação genética vegetal comum pCAMBIA1301 do Australia CAMBIA Laboratory (Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture), que carrega o promotor forte do milho Ubiquitin1 com características constitutivas e de superexpressão, mediadas por *Agrobacterium*) da mesma maneira; extração e purificação dos produtos clivados enzimaticamente como clorofórmio:isopentanol (24:1) após a clivagem enzimática. A reação de ligação foi realizada através da utilização dos fragmentos da clivagem enzimática que compreendem o gene *SNAC2* e o vetor pU1301 clivado enzimaticamente (mostrado como a Figura 8), transformando *E. coli* DH10 β (obtida na Invitrogen Inc.). Os clones positivos foram verificados através da clivagem enzimática para a obtenção de um vetor transformado.

O vetor transformado foi introduzido na variedade de arroz "ZhongHua 11" (uma variedade de arroz disponível publicamente fornecida pelo China National Rice Research Institute) utilizando um sistema de transformação genética de arroz mediado por *Agrobacterium*. Uma planta transgênica foi então finalmente obtida através do pré-cultivo, da infestação, do co-cultivo, da verificação do calo com resistência à higromicina, da diferenciação, do enraizamento, do estabelecimento de mudas e do transplante. O sistema de transformação genética de arroz (subespécies de arroz japônica) mediado por *Agrobacterium* foi otimizado com base no método relatado por Hiei e outros (Ver: Efficient transformation of Rice, *Oryza sativa* L., mediated

by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA, 1994, *Plant Journal* 6:271-282).

A planta de arroz transgênica obtida foi denominada de T050U. A presente invenção obteve no total 23 plantas de arroz transgênicas independentes.

Exemplo 4: Verificação de Resistência ao Frio da Família T2 Transgênica para o Gene *SNAC2* no Estágio de Muda

Para verificar se a resistência ao frio de plantas de arroz transgênicas foi aumentada e se tal aumento estava relacionado a um gene *SNAC2* introduzido, a expressão do gene *SNAC2* em uma parte das plantas de arroz transgênicas foi detectada através da tecnologia de hibridização de Northern na presente invenção (a figura 3 mostra os resultados da hibridização de Northern, em que o método era o mesmo que o utilizado no Exemplo 2) e uma parte das famílias de plantas da geração T2 da presente invenção foi verificada em relação à resistência ao frio. As etapas específicas eram as seguintes: as sementes das famílias da geração T2 foram germinadas em meio MS contendo 50 mg/mL de higromicina durante 5 dias, após os quais as mudas que possuíam substancialmente o mesmo nível de germinação foram transplantadas em pequenos baldes vermelhos, dos quais a metade foi plantada com plantas superexpressas transgênicas e a outra metade foi plantada com plantas de controle do tipo selvagem. Quando as plantas cresceram até o estágio de 4 folhas, estas foram submetidas ao tratamento de baixa temperatura a 4°C. Após 5 dias de tratamento, foi observado que não ocorreram quaisquer alterações significativas nos fenótipos das plantas transgênicas ou das plantas de controle. Entretanto, após estas terem sido mudadas para as condições normais para a recuperação do crescimento durante 3 dias, foi observado que a maior parte das plantas de controle tinha folhas que estavam enroladas e ficaram murchas, enquanto apenas algumas das folhas das plantas transgênicas ficaram murchas; 7 dias após a recuperação do crescimento, quase todas as plantas de controle morreram, enquanto, em contraste, quase 50% da família superexpressa transgênica sobreviveram (figura 4). Isto provou que o gene *SNAC2* estava, sem dúvida,

relacionado à resistência ao frio e sua superexpressão podia aumentar a resistência ao frio de plantas transgênicas e que o aumento da resistência de plantas de arroz transgênicas estava certamente relacionado ao gene *SNAC2* introduzido.

5 Exemplo 5: Verificação de Resistência à Salinidade da Família T2 Transgênica para o Gene *SNAC2* no Estágio de Muda

Foi provado no Exemplo 4 que o desempenho de resistência ao frio de plantas transgênicas para o gene *SNAC2* da presente invenção no estágio de muda era significativamente maior que o do controle. Para verificar se *SNAC2* é capaz de proteger as plantas contra outros estresses, o desempenho de crescimento das plantas em um ambiente de alta salinidade foi comparado neste exemplo. A comparação é instruída como a seguir: a geração T2 da família de superexpressão transgênica foi germinada em meio MS contendo 50 mg/L de higromicina durante 4 dias, então as mudas transgênicas e as mudas de controle, que tinham o mesmo crescimento, foram transplantadas em caixas quadradas pequenas possuindo meio MS contendo 150 mmols/L de NaCl para manter o crescimento. O crescimento foi observado e 18 dias depois, foi feita uma medida no comprimento da raiz e na altura das plantas de cada muda jovem. Foi observado que não havia diferença no comprimento da raiz entre a planta transgênica com superexpressão de *SNAC2* ou com expressão que pode ser induzida de *SNAC2* e a planta de controle crescida na condição de alta salinidade. Entretanto, havia uma diferença evidente na altura da planta. O crescimento da planta de controle era substancialmente inibido na condição de alta salinidade, atingindo apenas 60% daquele da família de superexpressão transgênica (figura 5). Isto mostrava que a muda transgênica com superexpressão de *SNAC2* tinha maior tolerância à salinidade que a planta de controle, sugerindo que a planta transgênica para *SNAC2* da presente invenção pode aumentar substancialmente a resistência à salinidade nas plantas.

30 Exemplo 6: Gene *SNAC2* que possui Propriedades de Ativação da Transcrição e de Ligação ao DNA

As 3 repetições em tandem da região promotora OsERD1 de 90

bp

(5'-

CCCCGCGCGACGTCGACAAGTCGACAAGTGCGAGGAGCTAGCCATGT
GGGTCGTGCCCCGCGCGCGCCACGGCACGGCAACCCCGGAAACG-3',

5 SEQ ID NO:7) compreendendo as sequências centrais CATGTG e CACG foram sintetizadas no local com sítios de *EcoRI* e *SacI* em ambas as extremidades e foram ligadas diretamente no vetor de levedura pHIS2. Os clones positivos foram verificados e selecionados com o mesmo método de digestão enzimática, produzindo o vetor de transformação de levedura pHIS2-cis.

10 As etapas específicas para a execução do ensaio de transativação eram as seguintes:

1. O gene *SNAC2* de comprimento completo foi fundido ao vetor de expressão de levedura pDEST32 (obtido na Invitrogen Inc.).

Os iniciadores do gene foram planejados de acordo com o quadro aberto de leitura do vetor pDEST32 com base na sequência do clone de cDNA de comprimento completo (utilizando o software Primer 5.0). Os produtos da PCR obtidos foram purificados por PEG8000, antes de serem submetidos a uma reação de recombinação BP com um vetor intermediário pDONR221 (obtido na Invitrogen Inc.). O sistema de reação estava em um volume de 5 µL, incluindo 200 ng do produto da PCR, 50 ng de pDONR221, 2 µL de 5X BP Clonase Reaction Buffer e 2 µL de BP Clonase Mix e foi incubado para reação a 25°C durante aproximadamente 5 h. Uma *E. coli* DH10β (obtida na Invitrogen Inc.) foi transformada com o produto de reação para selecionar os clones positivos. Os plasmídeos dos clones positivos desejados foram finalmente submetidos a uma reação de recombinação LR, de forma que o fragmento gênico carregado pelo plasmídeo do clone positivo desejado foi fundido ao vetor de expressão de levedura pDEST32. A dita reação de recombinação LR é instruída como a seguir: uma *E. coli* DH10β (obtida na Invitrogen Inc.) foi transformada a 25°C durante aproximadamente 5 h com 100 ng de plasmídeo positivo da reação BP, 50 ng de pDEST32, 2 µL de 5X LR Clonase Buffer e 2 µL de LR Clonase Mix e os clones positivos foram selecionados.

2. Preparação e transformação de levedura competente (CLONTECH, Yeast Protocols Handbook) através do método de acetato de lítio (Li-Ac)

1) Reagente e Fórmula

5 A. Meio YPD:

20 g de Difco peptona
10 g de Extrato de levedura
20 g de glicose

diluídos com água destilada até 1 L e esterilizados durante 15 minutos.

10 B. Meio SD/Leu:

6,7 g de Base de nitrogênio de levedura sem aminoácidos
20 g de Pó de Ágar
20 g de glicose
0,69 g de -Leu DO Supplement (obtido na CLONTECH Inc.)

15 diluídos com água destilada até 1 L e esterilizados durante 15 minutos.

C. Tampão 10 TE: 0,1 M de Tris-HCl, 10 mM de EDTA, pH 7,5, esterilizado

D. 10 LiAc: 1 M de acetato de lítio, pH 7,5, esterilizado

E. Solução de PEG/LiAc

	Concentração Final	Para preparar 10 mL de solução
PEG4000	40%	8 mL de 50% de PEG
Tampão TE	1X	1 mL de 10X TE
LiAc	1X	1 mL de 10X LiAc

2) Etapas:

20 A. A colônia isolada de levedura com diâmetro de 2 a 3 mm foi dispersa com 1 mL de solução de YPD e então transferida para um frasco triangular contendo 10 mL de meio YPD.

B. Cultivada sob a rotação de 250 rpm a 30°C durante 16 a 18 h, de forma que a DO600 > 1,5.

25 C. Aproximadamente 5 mL da solução de levedura mencionada anteriormente foram transferidos para outro frasco triangular contendo 50 mL de meio YPD e a concentração foi detectada para obter DO600 = 0,2-0,3.

D. Cultivados a 30°C durante 3 h (230 rpm), neste ponto DO600

= 0,4 a 0,6 (se a DO₆₀₀<0,4, a cultura pode estar com problema).

E. A solução de levedura foi transferida para um tubo de centrifuga de 50 mL e centrifugada a 1000xg durante 5 minutos à temperatura ambiente.

5 F. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas com água duplamente destilada esterilizada e centrifugadas a 1000xg durante 5 minutos à temperatura ambiente.

G. O sobrenadante foi descartado, as células de levedura foram misturadas de forma homogênea com 1 mL de 1xTE/1xLiAc recém-preparado.

H. 200 ng do DNA do plasmídeo de fusão foram colocados em um tubo de centrífuga de 1,5 mL e 100 µL de células competentes de levedura foram adicionados e misturados de forma homogênea, então 600 µL de PEG/LiAc foram adicionados, misturados de forma homogênea através de centrifugação em velocidade alta e cultivados a 30°C durante 30 min (200 rpm).

I. 70 µL de DMSO (100%) foram adicionados, invertidos suavemente várias vezes, colocados em banho de água a 42°C durante 15 min e então colocados em gelo durante 2 min.

20 J. Centrifugados a 14000 rpm durante 5 segundos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e as células foram dispersas com 500 µL de 1x tampão TE.

K. 100 µL de células transformadas foram revestidas uniformemente sobre uma placa de -Leu/SD, cultivados de forma invertida em uma incubadora a 30°C durante 2 a 4 dias, até que os clones aparecessem.

3. Verificação da atividade de transcrição do gene *SNAC2* e do mutante de deleção do mesmo com base na expressão do gene repórter LacZ no ensaio de beta-galactosidase

1) Reagente e Formulação

30 A. Tampão Z

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	16,1	g/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5,5	g/L

KCl	0,75	g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,246	g/L

pH ajustado em 7,0 e esterilizado.

B. Solução estoque de X-gal (20 mg/mL)

5 C. Solução de tampão Z/solução de X-gal:

100 mL de tampão Z:

0,27 mL de β -mercaptoetanol

1,67mL de solução estoque de X-gal

2) Etapas:

10 A. Foi permitido que o clone transformado crescesse até 1 a 3 mm (30°C, 2 a 4 dias)

B. Papel de filtro Watman esterilizado redondo de tamanho apropriado foi colocado sobre a placa asséptica de 10 cm, aproximadamente 2,5 a 5 mL de tampão Z/solução de X-gal foram adicionados para umedecer
15 o papel de filtro e foi evitada a formação de bolhas.

C. Outro papel de filtro esterilizado limpo foi colocado através de uma pinça sobre a placa de Petri com o clone em crescimento e o papel de filtro foi ligeiramente pressionado para se aderir o clone ao papel de filtro.

D. Quando o papel de filtro estava umedecido, este foi descoberto
20 através da pinça e o papel de filtro foi colocado em nitrogênio líquido durante 10 s com a superfície aderida com os clones com a face para cima, então foi descongelado à temperatura ambiente para romper as células de levedura.

F. O papel de filtro com a superfície aderida com os clones com a face para cima foi colocado cuidadosamente sobre o papel de filtro umedecido anteriormente e foi evitada a formação de bolhas.
25

G. O papel de filtro foi colocado a 30°C (30 min a 8 h) e o fato do gene ter a função de ativação foi determinado de acordo com a ocorrência de ponto azul.

30 As etapas de implementação específicas do ensaio de um híbrido de levedura eram como a seguir:

1. O gene *SNAC2* de comprimento completo foi fundido ao vetor

de expressão de levedura pGAD-Rec2 (obtido na CLONTECH Inc.).

Os iniciadores do gene F

(5-TAGAATTCGACGAGGAGCTGGTGATGC-3,

iniciador específico mais o sítio de clivagem enzimática *EcoRI*) e

5 R (5-TAGGATCCCCCTCGTCGTCGTTTCAGTCC-3,

iniciador específico mais o sítio de clivagem enzimática *BamHI*) foram planejados de acordo com o quadro aberto de leitura do vetor pGAD-Rec2 com base na sequência do clone de cDNA de comprimento completo. Os produtos da PCR obtidos foram digeridos duplamente, purificados com clorofórmio:isopentanol e ligados ao vetor pGAD-Rec2 submetido à mesma digestão dupla. A *E. coli* DH10 β (obtida na Invitrogen Inc.) foi transformada e os clones positivos foram selecionados e verificados com o mesmo método de digestão enzimática, produzindo o vetor de transformação de levedura pGAD-SNAC2.

15 2. As 3 repetições da sequência da região promotora OsERD1 de 90 bp contendo as sequências centrais CATGTG e CACG foram ligadas no vetor pHIS2 (obtido na CLONTECH Inc.).

As 3 repetições em tandem da região promotora OsERD1 de 90 bp

20 (5'-CCCCGCGCGACGTCGACAAGTCGACAAGTGCGAGGAGCTAGCCATGTGGGTCTGTGCCCCGCGCGCGCCACGGCACGGCAACCCCGGAAACG-3')

compreendendo as sequências centrais CATGTG e CACG foram sintetizadas no local com sítios de *EcoRI* e *SacI* em ambas as extremidades e foram ligadas diretamente no vetor de levedura pHIS2. Os clones positivos foram verificados e selecionados com o mesmo método de digestão enzimática, produzindo o vetor de transformação de levedura pHIS2-cis.

25 3. As células competentes foram preparadas e a transformação foi realizada com um vetor de levedura (o método era o mesmo que o do ensaio de transativação). As células transformadas com o vetor binário desejado (preparando ao mesmo tempo o controle positivo e o controle negativo) foram revestidas sobre uma placa de Petri de SD/Leu-/Trp-, então cultivadas

em uma incubadora a 30°C, até que o tamanho de colônia fosse de aproximadamente 2 mm.

4. A mesma colônia foi cultivada por estriamento em uma placa de Petri de SD/Leu-/Trp-/His- contendo 0 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM e 40 mM de 3-AT e o desempenho de crescimento foi observado.

Exemplo 7: Localização subcelular de SNAC2

- Para determinar a localização da expressão do gene *SNAC2* em uma célula, foi construída uma proteína de fusão GFP-NLS (sinal de localização nuclear). Ou seja, o perfil de expressão do gene na célula foi determinado de acordo com a expressão de GFP. Era sabido que o sinal de localização nuclear (NLS) do gene NAC pode estar localizado em 71-83 AA de acordo com os artigos publicados anteriormente sobre o gene NAC (Miki Fujita, Kazuo Shinozaki e outros, "A Dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway." *Plant J* (2004) 39, 863-876 e Honghong Hu e outros, "Over expressing a NAM, ATAF and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice." *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 12987-12992). Neste contexto, a localização subcelular do gene foi determinada de acordo com a região de expressão na célula desta sequência fundida com GFP. O fragmento de 1-144 AA da sequência da presente invenção foi fundido com um vetor pCAMBIA1391-GFP (que carrega o promotor ubiquitin1), através do que a localização celular da proteína *SNAC2* pode ser deduzida de acordo com a localização de expressão de GFP na célula em plantas transgênicas $P_{SNAC2}::\Delta SNAC2$ -GFP. O vetor pCAMBIA1391-EGFP (ver a figura 9) foi reconstruído com base no pCAMBIA1391 (um vetor de transformação genética de plantas comumente utilizado no mundo), em que o gene GUS carregado foi substituído pelo gene EGFP, com o promotor Ubiquitin1 precedendo a GFP. O vetor pCAMBIA1391 era do Australia CAMBIA Laboratory (Center for the Application of Molecular Biology to International Agriculture) e está disponível publicamente.

O método para a construção do vetor gênico fundido foi descrito como a seguir: os iniciadores PF (5-GGATCCCTCCTCTCCTCTTCCCAT,

SEQ ID NO: 8, mais ligante de sítio *Bam*HI) e PR (5-GAATTCGTTCTTCTTGCGG, SEQ ID NO: 9, mais ligante com *Eco*RI) foram planejados; o vetor pGEM-SNAC2 construído no Exemplo 1 anterior foi utilizado como molde. O gene *SNAC2* foi amplificado através de um programa

5 de amplificação de pré-desnaturação a 94°C durante 3 min; 30 ciclos de 94°C durante 30 s, 55°C durante 30 s, 72°C durante 3 min; extensão a 72°C durante 5 min; e o produto amplificado sofreu digestão dupla com *Eco*RI e *Hind*III e foi ligado em um vetor pCAMBIA1391-EGFP que foi submetido à

10 mesma digestão dupla. O calo de arroz foi transformado com o vetor de fusão p1391-GFP-NLS utilizando um método de transformação genética mediado por agrobactéria (o mesmo que o método utilizado no Exemplo 3), o calo com resistência foi obtido sob pressão seletiva com higromicina (métodos específicos que são descritos no Exemplo 3) e a expressão de GFP foi observada sob microscopia fluorescente (ver a figura 7A). O calo com resistên-

15 cia expressa foi dividido em partes e observado sob microscopia confocal para determinar a expressão intracelular de GFP. A figura 7B mostra que a GFP é expressa somente nos núcleos sob a observação por microscopia confocal, que indica que a sequência de 1-144 AA já inclui o NLS, de forma que a GFP podia ser localizada nos núcleos, isto é, a proteína *SNAC2* foi

20 localizada nos núcleos. Este exemplo provou que o fragmento de 1-144 AA da sequência de acordo com a presente invenção inclui um NLS intacto e que a proteína *SNAC2* fica localizada no núcleo da célula.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Huazhong Agricultural University

25 <120> MELHORIA DO DESEMPENHO DE PLANTAS TOLERANTES AO FRIO E A SAIS COM O GENE *SNAC2* DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO DO ARROZ

<130>

<141> 2007-3

30 <160> 2

<170> PatentIn versão 3.1

<210> 1

<211> 1529

<212> cDNA

<213> *Oryza sativa*

<220>

5 <221> ORF

<222> (113)..(1024)

GCCAAGCCCTCCTCTCCTCTTCCCAACACTAGTAGGATAAAGCCACAGA
 GAGAGCAGTAGTAGTAGCGAGCTCGCCGGAGAACGGACGATCACCGG
 AGAAGGGGGGAGAGAGATGAGCGGCGGTTCAGGACCTGCAGCTGCCGCC
 10 GGGGTTCCGGTTCCACCCGACGGACGAGGAGCTGGTGATGCACTACCT
 CTGCCGCCGCTGCGCCGGCCTCCCCATCGCCGTCCCCATCATCGCCG
 AGATCGACCTCTACAAGTTCGATCCATGGCAGCTTCCCCGGATGGCGC
 TGTACGGAGAGAAGGAGTGGTACTTCTTCTCCCCGCGAGACCGCAAGT
 ACCCGAACGGGTGCGGGCCGAACCGCGCCGCGGGTTCGGGGTACTG
 15 GAAGGCGACCGGCGCCGACAAGCCGGTGGGCTCGCCGAAGCCGGTG
 GCGATCAAGAAGGCCCTCGTCTTCTACGCCGGCAAGGCGCCCAAGGG
 CGAGAAGACCAACTGGATCATGCACGAGTACCGCCTCGCCGACGTCTGA
 CCGCTCCGCCCCGCAAGAAGAACAGCCTCAGGTTGGATGATTGGGTGCT
 GTGCCGGATTTACAACAAGAAGGGCGGGCTGGAGAAGCCGCGCGGCCG
 20 CGGCGGTGGCGGGCGGGGATGGTGAGCAGCGGCGGGCGGCGTCCA
 GAGGAAGCCGATGGTGGGGGTGAACGCGGCGGTGAGCTCCCCGCCG
 GAGCAGAAGCCGGTGGTGGCGGGGCCGGCGTTCCCGGACCTGGCGG
 CGTACTACGACCGGCCGTCGGA CTGATGCCGCGGCTGCACGCCGAC
 TCGAGCTGCTCGGAGCAGGTGCTGTCGCCGGAGTTGCGGTGCGAGGT
 25 GCAGAGCCAGCCCAAGATCAGCGAGTGGGAGCGCACCTTCGCCACCG
 TCGGGCCCATCAACCCCGCCGCCTCCATCCTCGACCCCGCCGGCTCC
 GGCGGCCTCGGCGGCCTCGGCGGCGGCGGCAGCGACCCCCTCCTCC
 AGGACATCCTCATGTACTGGGGCAAGCCATTCTAGACGACCAAAAAAAA
 AAAAAACAACCGCATTGGCAGCAATGGTGTCACTGAACACCGTGACG
 30 GCTAGCTAGCTTCATGGCCGGTGAAC TTTGACTCAGGCGAGCCGCCGG
 AGTTGACTCAAAGATAATTAAAAGAAGTGTTTTAAGTGGATTGGATTGGA
 TTAGACAGAGGAGATGAGGACTCGAGAAAGGCGGCGATGAGACCGTG

GTTGGGGGGACCCTGGCCTGGACTGAACGACGACGAGGCAGCAGCAG
AAAGATGGTGCAATTGCATCGGGTGGCATGTCAGTGTGTGTGTATAGTG
GCATGTACATAGTACATGGTGATTGATTCGGTATACAGGGGGCTAGCTT
TCCTGTTTCTGTTTCTTCATTGGTTAATTATTACTCCCATTATAAGGTCTT
5 CTTCAGGGTTGCTAGCTTAATTAATTAATTAATTAGCCCAGTGGTTGAAG
TGTAAGTCAAATTCATCAAGTCAGAGACTGGAATAATACAATACAGTAC
TGC

REIVINDICAÇÕES

1. Planta transformada caracterizada pelo fato de que compreende uma construção de DNA recombinante que compreende um promotor funcional em uma célula vegetal posicionado para fornecer a expressão de um polinucleotídeo que possui uma sequência com pelo menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% de identidade em relação a-
5 aquele nas posições 112-1023 da SEQ ID NO:1.

2. Planta transformada caracterizada pelo fato de que compreende uma construção de DNA recombinante que compreende um promotor
10 funcional em uma célula vegetal posicionado para fornecer a expressão de um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo pelo menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% idêntico ao codificado pela sequência de polinucleotídeo nas posições 112-1023 da SEQ ID NO:1.

3. Planta transformada de acordo com a reivindicação 1 ou 2,
15 caracterizada pelo fato de que a dita planta é uma planta de cultivo.

4. Processo de produção de uma planta transformada que possui uma propriedade melhorada, caracterizado pelo fato de que compreende a transformação de uma planta com uma construção recombinante que compreende um promotor funcional em uma célula vegetal posicionado para
20 fornecer a expressão de um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo útil para aumentar a tolerância ao frio, a tolerância à seca ou a tolerância a sais de uma planta, em que o dito polinucleotídeo possui uma sequência com pelo menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% de identidade em relação aquele nas posições 112-1023 da SEQ ID NO:1.

25 5. Processo de produção de uma planta transformada que possui uma propriedade melhorada, caracterizado pelo fato de que o dito processo compreende a transformação de uma planta com uma construção recombinante que compreende um promotor funcional em uma célula vegetal posicionado para fornecer a expressão de um polinucleotídeo que codifica
30 um polipeptídeo útil para aumentar a tolerância ao frio, a tolerância à seca ou a tolerância a sais de uma planta, em que o dito polipeptídeo é pelo menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% idêntico ao codi-

ficado pela sequência de polinucleotídeo nas posições 112-1023 da SEQ ID NO:1.

6. Processo de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que a dita planta transformada é uma planta de cultivo.

5 7. Planta que exibe uma propriedade melhorada quando comparada à planta de controle, caracterizada pelo fato de que a característica alterada é selecionada do grupo que consiste em maior tolerância ao frio, maior tolerância à privação de água e maior tolerância a sais ou combinações das mesmas, em que a planta possui maior expressão ou atividade de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo que possui pelo menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% de identidade aquele nas posições 112-1023 da SEQ ID NO:1.

10 8. Planta que exibe uma propriedade melhorada quando comparada à planta de controle, caracterizada pelo fato de que a característica alterada é selecionada do grupo que consiste em maior tolerância ao frio, maior tolerância à privação de água e maior tolerância a sais ou combinações das mesmas, em que a planta possui maior expressão ou atividade de um polipeptídeo pelo menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% idêntico ao codificado pela sequência de polinucleotídeo nas posições 112-1023 da SEQ ID NO:1.

20 9. Planta transformada de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizada pelo fato de que a dita planta é uma planta de cultivo.

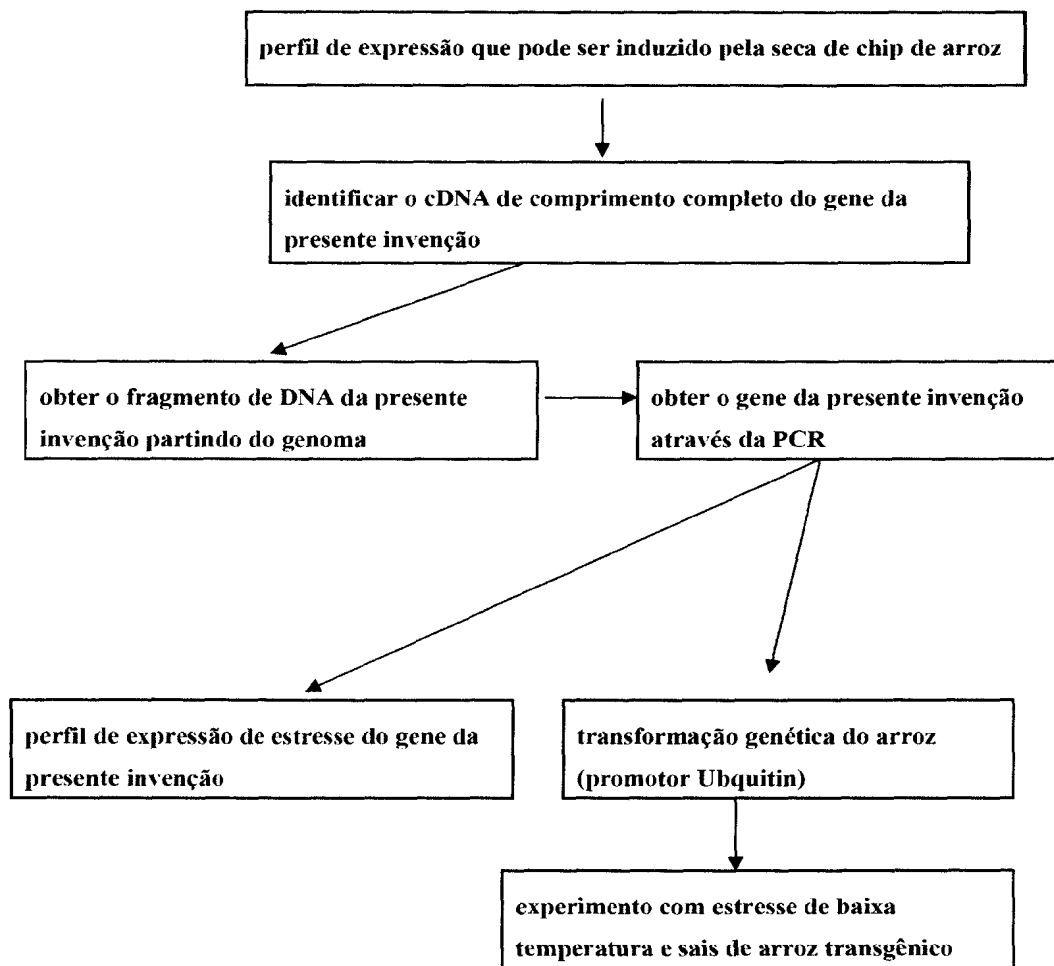


FIG. 1

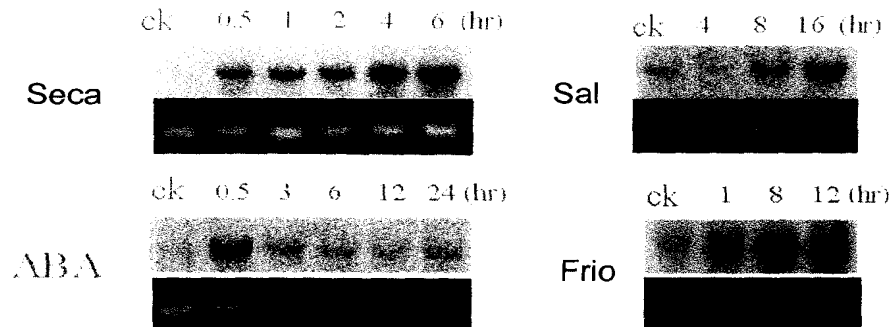


FIG. 2

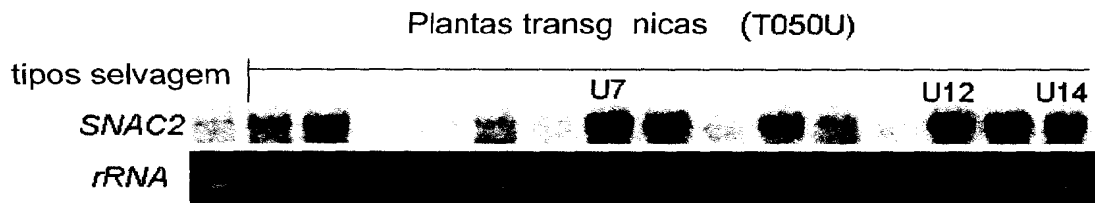


FIG. 3

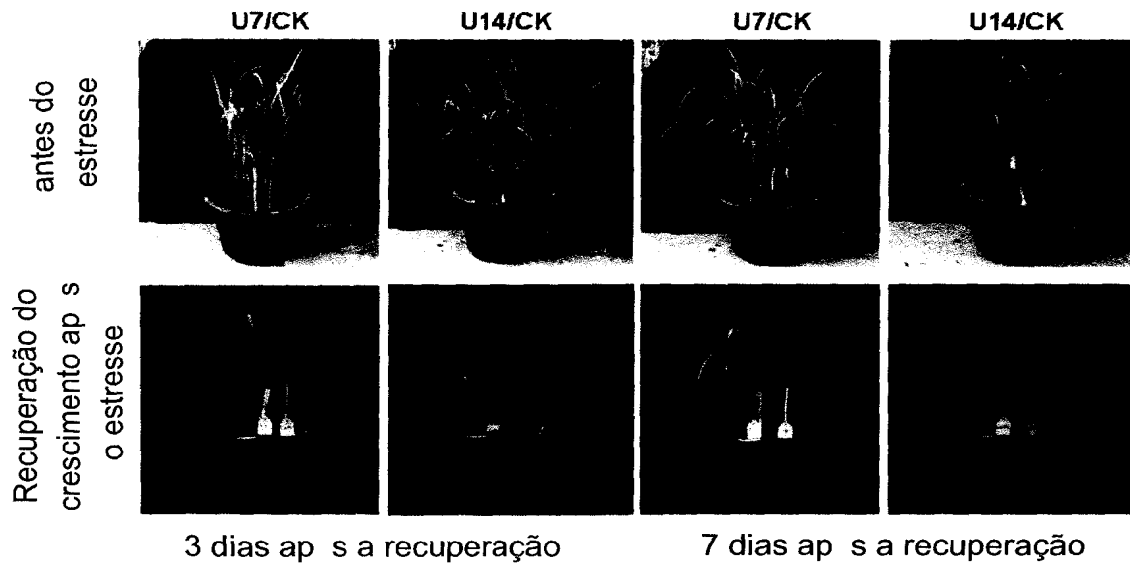


FIG. 4

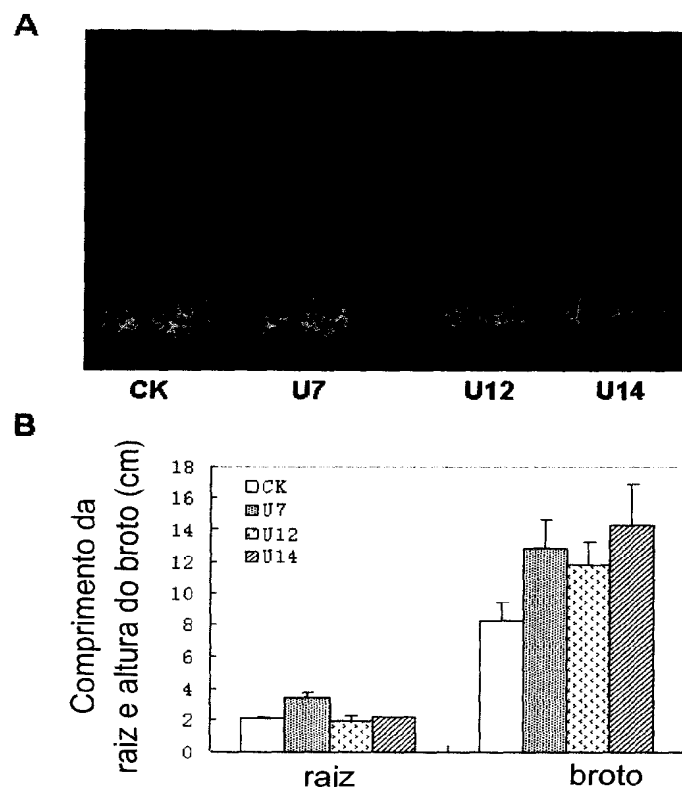


FIG. 5

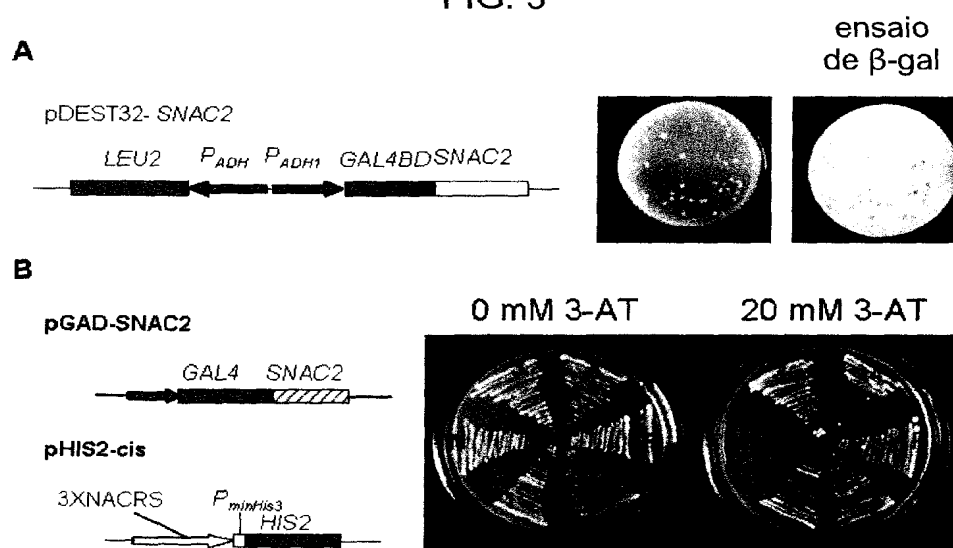


FIG. 6

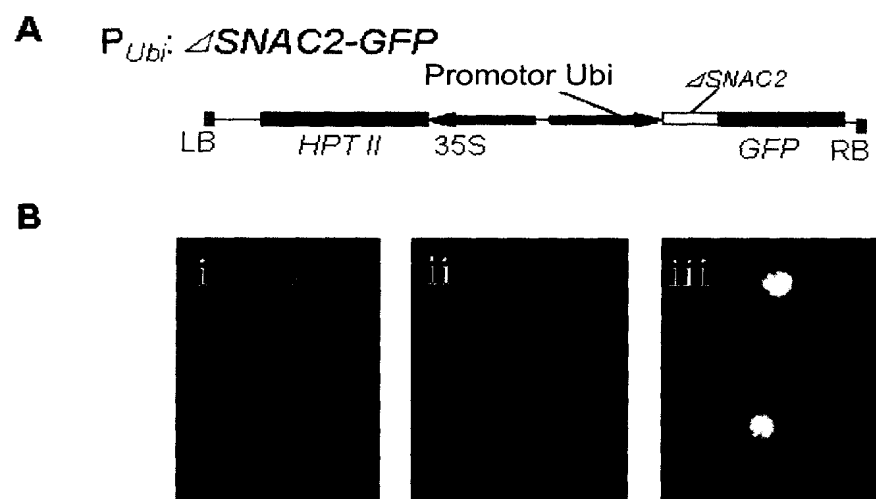


FIG. 7

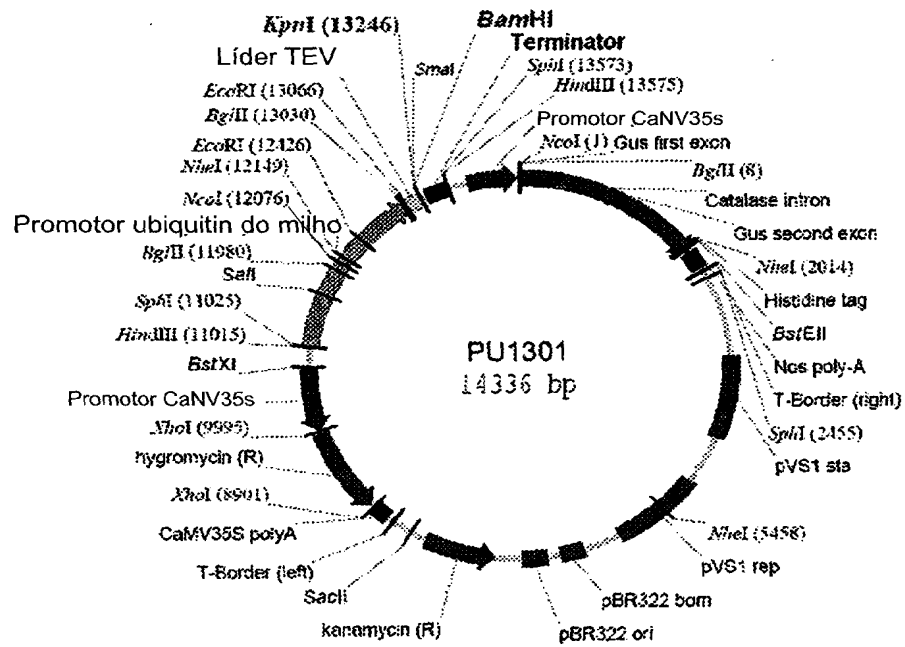


FIG. 8

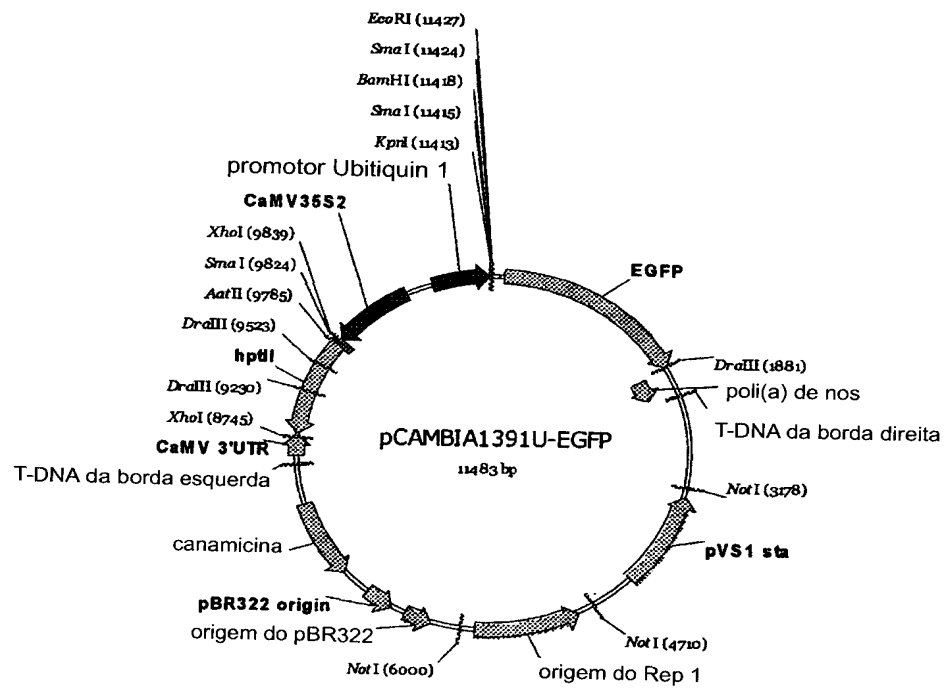


FIG. 9

RESUMO

Patente de Invenção: **"MELHORIA DO DESEMPENHO DE PLANTAS TOLERANTES AO FRIO E A SAIS COM O GENE SNAC2 DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO DO ARROZ"**.

5 A presente invenção refere-se a um gene NAC responsivo ao estresse (SNAC2) de arroz que compreende (a) uma sequência de DNA que é mostrada na posições 112-1023 da SEQ ID NO:1 ou (b) uma sequência de DNA que codifica a mesma proteína que a codificada por (a). A presente invenção refere-se ainda ao uso do dito gene no aumento da tolerância de

10 plantas à seca e ao estresse salino.