



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

**(11) BR 112014031449-7 B1**



**(22) Data do Depósito:** 06/11/2012

**(45) Data de Concessão:** 31/08/2021

**(54) Título:** DNA COM ATIVIDADE DE PROMOÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM FOLHAS MADURAS DE PLANTAS, DE INDUÇÃO À FORMAÇÃO DE BOTÃO DE FLOR, DE FLORESCIMENTO DE ESPIGA E RAMIFICAÇÃO DE PLANTA, VETOR E MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE PLANTA TRANSFORMADA

**(51) Int.Cl.:** C12N 15/09; A01H 1/00; A01H 5/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 21/06/2012 JP 2012-140231.

**(73) Titular(es):** TOYOTA JIDOSHA KABUSHIKI KAISHA.

**(72) Inventor(es):** SATORU NISHIMURA; KAZUYO SUZUKI; SHOKO TSUZUKI.

**(86) Pedido PCT:** PCT JP2012078716 de 06/11/2012

**(87) Publicação PCT:** WO 2013/190720 de 27/12/2013

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 16/12/2014

**(57) Resumo:** DNA COM ATIVIDADE DE PROMOÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM FOLHAS MADURAS DE PLANTAS, DE INDUÇÃO À FORMAÇÃO DE BOTÃO DE FLOR, DE FLORESCIMENTO DE ESPIGA E RAMIFICAÇÃO DE PLANTA, VETOR E MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE PLANTA TRANSFORMADA. A presente invenção fornece DNA para uso em uma eficiente reprodução cruzada de plantas, como plantas de cana-de-açúcar e espécies de planta proximamente relacionadas a isso. Particularmente, o DNA de acordo com a presente invenção apresenta atividade de promoção de expressão gênica em folhas maduras de plantas, de indução à formação de botão de flor, de florescimento de espiga e ramificação de planta. Ainda, a presente invenção fornece um vetor recombinante compreendendo o referido DNA, bem como um método de produção de planta transformada através do uso do referido DNA no processo de transformação, onde a planta particularmente pertence à família Gramineae.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"DNA COM ATIVIDADE DE PROMOÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA EM FOLHAS MADURAS DE PLANTAS, DE INDUÇÃO À FORMAÇÃO DE BOTÃO DE FLOR, DE FLORESCIMENTO DE ESPIGA E RAMIFICAÇÃO DE PLANTA, VETOR E MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE PLANTA TRANSFORMADA"**.

**CAMPO DA TÉCNICA**

[0001] A presente invenção refere-se a DNA compreendendo DNA de regulação de expressão de gene que tem atividade de promover expressão de gene especificamente em folhas maduras e um gene de indução à formação de botão de flor e que tem funções de promover a formação de botão de flor ou florescimento de espiga e/ou ramificação de uma planta. Também, a presente invenção se refere ao uso desse DNA.

**ANTECEDENTES DA TÉCNICA**

[0002] A cana de açúcar é cultivada sobre uma área que totaliza aproximadamente 20.000.000 de hectares no Brasil, Índia e outras regiões, sendo que a mesma é uma planta de recurso usada para produção de açúcar e produção de etanol. Através da popularização de biocombustíveis no futuro, o crescimento contínuo de demanda para a cana de açúcar é antecipado e, conseqüentemente, é esperada a produção intensificada da mesma.

[0003] Com o objetivo de fornecimento não dispendioso e estável de plantas de cana de açúcar como matéria-prima, têm sido tentado ativamente o aprimoramento e reprodução de variedades de cana de açúcar. Até agora, o aprimoramento e reprodução de variedades de cana de açúcar tem sido realizado através de reprodução cruzada (Documento de Não-Patentário 1).

[0004] Entretanto, as plantas de cana de açúcar têm raízes nos trópicos, e florescimento e florescimento de espiga são impossíveis no

Japão, cuja maior parte fica na "zona temperada". Adicionalmente, devido à complexidade genômica estrutural, tem sido muito difícil obter aprimoramento e reprodução de variedade eficaz.

[0005] No passado, a reprodução cruzada foi realizada entre espécies de planta determinadas com base em experiência ou intuição e muitas plantas de progênie foram avaliadas e selecionadas extensivamente. A fim de realizar cruzamentos, em geral, é necessário um processo de indução formação de botão de flor, florescimento, polinização, promoção de viabilização, e produção de semente. No caso da cana de açúcar, esse processo pode ser implantado apenas uma vez por ano mesmo em um campo que seja adequado para o cultivo. Portanto, o desenvolvimento de uma única variedade de planta foi muito demorado.

[0006] Adicionalmente, foi muito difícil realizar cruzamentos como desejado em casos em que variedades da planta a serem submetidas a cruzamentos tinham dificuldade de florescimento ou em casos em que o tempo de florescimento de uma variedade da planta era diferente daquele de outra variedade da planta.

[0007] Consequentemente, tem havido uma forte demanda para o desenvolvimento de um método para reprodução cruzada eficiente de cana de açúcar na técnica.

[0008] Até agora tem sido reportado que a formação de botão de flor (florescimento da espiga) tem sido induzido através de superexpressão de genes de indução à formação de botão de flor, tais como genes FT ou OsHd3a, em *Arabidopsis thaliana* ou *Oryza sativa* (Documentos de Patente 1 a 3; e Documentos Não de Patente 2 e 3). Adicionalmente, tem sido verificado que os genes FT ou OsHd3a exercem efeitos similares em muitas outras espécies de planta.

[0009] Infelizmente, não tem havido nenhum relato relativo a canas de açúcar recombinantes superexpressando os genes como descrito acima.

## **DOCUMENTOS DA TÉCNICA ANTERIOR**

### **DOCUMENTOS DE PATENTE**

Documento de Patente 1: JP 2000-139250 A

Documento de Patente 2: JP 2002-511270 A

Documento de Patente 3: JP 2002-153283 A

### **DOCUMENTOS NÃO DE PATENTE**

[00010] Documento Não de Patente 1: Kiyomatsu Miyasato, "*Satoukibi to sono saiba*" ("Sugarcane and Cultivation thereof"), 1986, Nihon Bummitsuto Kogyokai.

[00011] Documento Não de Patente 2: Kardailsky, I. et al., Science, 3 de dezembro de 1999; 286 (5446): 1962 a 1965.

[00012] Documento Não de Patente 3: Kojima, S. et al., Plant Cell Physiol., Outubro de 2002; 43 (10): 1096 a 1105

## **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

### **OBJETIVO A SER ATINGIDO PELA INVENÇÃO**

[00013] É um objetivo da presente invenção fornecer uma técnica que habilite reprodução cruzada eficiente de plantas, a, em particular, plantas de cana de açúcar e espécies de planta intimamente relacionadas às mesmas.

### **MEIOS PARA ATINGIR O OBJETIVO**

[00014] Os presentes inventores têm conduzido estudos concentrados a fim de atingir o objetivo acima. Como resultado, os mesmos descobriram que a formação de botão de flor (florescimento da espiga) poderia ser promovida em plantas e plantas interférteis poderiam ser obtidas eficazmente expressando-se um gene de indução à formação de botão de flor sob a regulação de DNA regulação de expressão de gene tendo a atividade de promover expressão de gene especificamente em folhas maduras. Isso tem levado à realização da presente invenção.

[00015] Especificamente, a presente invenção abrange as seguintes características [1] a [5].

[1] DNA compreendendo qualquer um dos DNAs (a) a (d) abaixo:

(a) DNA que consiste da sequência de nucleotídeos como mostrada em SEQ ID NO: 1;

(b) DNA que consiste de uma sequência de nucleotídeos que tem eliminação, substituição, adição, ou inserção de 1 ou uma pluralidade de nucleotídeos na sequência de nucleotídeos como mostrado em SEQ ID NO: 1 e que tem atividade de promover expressão de gene especificamente em folhas maduras;

(c) DNA que consiste de uma sequência de nucleotídeos que tem 90% ou maior identidade de sequência com a sequência de nucleotídeos como mostrado em SEQ ID NO: 1 e que tem atividade de promover expressão de gene especificamente em folhas maduras; e

(d) DNA hibridação em condições severas para DNA que consiste de uma sequência complementar à sequência de nucleotídeos como mostrado em SEQ ID NO: 1 e que tem atividade de promover expressão de gene especificamente em folhas maduras e

[00016] DNA que codifica qualquer um de polipeptídeos (e) a (g) abaixo:

(e) um polipeptídeo que consiste da sequência de aminoácido como mostrado em SEQ ID NO: 7;

(f) um polipeptídeo que consiste de uma sequência de aminoácido que tem eliminação, substituição, adição, ou inserção de 1 ou um pluralidade de aminoácidos na sequência de aminoácido como mostrado em SEQ ID NO: 7 e que tem atividade de promover formação de botão de flor ou florescimento de espiga; e

(g) um polipeptídeo que consiste de uma sequência de aminoácido que tem 90% ou maior identidade de sequência com a sequência de aminoácido como mostrado em SEQ ID NO: 7 e que tem atividade de promover formação de botão de flor ou florescimento de espiga,

em que o DNA tem uma função de promover formação de botão de flor ou florescimento de espiga e/ou ramificação de uma planta.

[2] Um vetor recombinante que compreende a DNA de acordo com [1].

[3] Uma planta transformada em que o DNA de acordo com [1] ou o vetor recombinante de acordo com [2] é introduzido.

[4] A planta transformada de acordo com [3], que pertence à família *Gramineae*.

[5] A planta transformada de acordo com [4], que pertence ao gênero *Saccharum*, *Sorghum* ou *Miscanthus*.

[00017] Esta descrição inclui parte ou todo o conteúdo conforme revelado na descrição e/ou nos desenhos do Pedido de Patente nº JP 2012-140231, que é um documento de prioridade do presente pedido.

### **EFEITOS DA INVENÇÃO**

[00018] A presente invenção pode fornecer uma técnica que possibilita a reprodução cruzada eficaz de plantas e, em particular, plantas de cana-de-açúcar e espécies de planta proximalmente relacionadas às mesmas.

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

[00019] A Figura mostra a sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 4) de ecc0002 EST derivado de *Saccharum officinarum* (pesquisado para usar o DFCI Sugarcane Gene Index).

[00020] A Figura 2 mostra os resultados de análise de expressão de ecc0002 EST para tecidos individuais de *Saccharum spp.* cv. NiF8. O nível de expressão mais alto confirmado para folhas maduras é designado como 100%.

[00021] A Figura 3 mostra a sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 5) da região reguladora de expressão de gene do gene ecc0002 em que uma sequência de reconhecimento de enzima de restrição de *HindIII* e uma sequência de reconhecimento de enzima de restrição de *BlnI* foram

inseridas nas terminações 5' e 3', respectivamente.

[00022] A Figura 4(A) mostra a sequência de nucleotídeos (CDS: 153 a 692) (SEQ ID NO: 6) do gene Hd3a derivado do grupo *Oryza sativa Japonica* e a Figura 4(B) mostra a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de um polipeptídeo codificado por tal gene.

[00023] A Figura 5 mostra esquematicamente um vetor de expressão de gene que contém a região reguladora de expressão de gene do gene ecc0002 gene e o gene  $\beta$ -glucuronidase ligados entre si.

[00024] A Figura 6 mostra os resultados de análise de nível de expressão de gene GUS para tecidos individuais de uma cana-de-açúcar transgênica em que a expressão do gene  $\beta$ -glucuronidase é regulada pelo DNA regulador de expressão do gene ecc0002. O nível de expressão mais alto confirmado para folhas maduras da cana-de-açúcar transgênica é designado como 100%.

[00025] A Figura 7 mostra a sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 3) de DNA que compreende DNA regulador de expressão do gene ecc0002 e o gene Hd3a de arroz inserido em um vetor de expressão de gene; em que uma letra em caixa alta representa o DNA regulador de expressão do gene ecc0002 e uma letra em caixa baixa representa o gene Hd3a de arroz.

[00026] A Figura 8 mostra esquematicamente um vetor de expressão de gene que contém a região reguladora de expressão de gene do gene ecc0002 gene e o gene Hd3a de arroz ligados entre si.

[00027] A Figura 9 mostra os resultados de análise de nível de expressão de gene Hd3a de arroz para tecidos individuais de uma cana-de-açúcar transgênica em que a expressão do gene Hd3a de arroz é regulada pelo DNA regulador de expressão do gene ecc0002, uma cana-de-açúcar transgênica em que a expressão do gene Hd3a de arroz é regulada pelo promotor CaMV 35S e uma cana-de-açúcar do tipo selvagem. Na tabela, "ecc0002 transgênico pro." refere-se a uma cana-

de-açúcar transgênica em que a expressão de gene Hd3a de arroz é regulada pela região reguladora de expressão de gene do gene ecc0002 e "35SCaMV transgênico pro." refere-se a uma cana-de-açúcar transgênica em que a expressão de gene Hd3a de arroz é regulada pelo promotor CaMV 35S.

[00028] A Figura 10 mostra os resultados da análise da capacidade de introduzir ramificação de uma cana-de-açúcar transgênica em que a expressão do gene Hd3a de arroz é regulada por DNA regulador de expressão do gene ecc0002. O número de ramificação é a média do número de ramificação para canas-de-açúcar transgênicas (n = 5) e aquele para canas-de-açúcar do tipo selvagem (n = 3).

[00029] A Figura 11 mostra os resultados da análise da capacidade de introduzir emergência de espiga de uma cana-de-açúcar transgênica em que a expressão do gene Hd3a de arroz é regulada por DNA regulador de expressão do gene ecc0002. O número de emergência de espiga é a média do número de emergência de espiga para canas-de-açúcar transgênicas (n = 5) e aquele para canas-de-açúcar do tipo selvagem (n = 3).

### **MODALIDADES PARA EXECUTAR A INVENÇÃO**

[00030] Adiante, a presente invenção é descrita em detalhes.

[00031] DNA de acordo com a presente invenção que tem uma função de promover formação de botão de flor ou emergência de espiga e/ou ramificação de uma planta compreende DNA regulador de expressão de gene que tem atividade de promover expressão de gene especificamente em folhas maduras e um gene indutor de formação de botão de flor.

[00032] Na presente invenção, uma função de "promover a formação de botão de flor ou emergência de espiga de uma planta" é uma função de promover a diferenciação e/ou formação de botões de flor ou órgãos de flor ou uma formação de promover a emergência de espiga e/ou



florescimento de uma planta em que DNA que tem tal função foi introduzido (isto é, uma função de encurtar o período até a emergência de espiga e/ou florescimento).

[00033] Na presente invenção, uma função de "promover ramificação de uma planta" é uma função de promover a formação de ramos laterais a partir de um ponto na proximidade da base, encurtar o período até a iniciação da formação de ramo e/ou aumentar o número de ramos laterais de uma planta em que DNA que tem tal função foi introduzido.

[00034] No início, o DNA regulador de expressão de gene que tem atividade de promover a expressão de gene especificamente em folhas maduras é descrito. Adiante, o termo "DNA regulador de expressão de gene que tem atividade de promover a expressão de gene especificamente em folhas maduras" é também referido com "DNA regulador de expressão de gene" e esses termos são usados no presente documento de modo intercambiável.

[00035] O DNA regulador de expressão de gene de acordo com a presente invenção compreende qualquer um de DNAs (a) a (d) abaixo:

(a) DNA que consiste na sequência de nucleotídeos, conforme mostrado na SEQ ID NO: 1;

(b) DNA que consiste em uma sequência de nucleotídeos que tem eliminação, substituição, adição, ou inserção de um ou uma pluralidade de nucleotídeos na sequência de nucleotídeos, conforme mostrado na SEQ ID NO: 1 e que tem atividade de promover expressão de gene, especificamente em folhas maduras;

(c) DNA que consiste em uma sequência de nucleotídeos que tem 90% ou maior de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeos, conforme mostrado em SEQ ID NO: 1, e que tem atividade de promover expressão de gene especificamente em folhas maduras; e

(d) DNA que hibridiza em condições rigorosas para DNA que consiste em uma sequência complementar à sequência de nucleotídeos,

conforme mostrado na SEQ ID NO: 1, e que tem a atividade de promover expressão de gene especificamente em folhas maduras.

[00036] O DNA regulador de expressão de gene da presente invenção pode ser obtido da seguinte maneira: genes candidatos expressos especificamente em folhas maduras são obtidos por análise de expressão de gene com o uso de RNAs totais derivados de tecidos de cana-de-açúcar individuais (de talos, folhas maduras, folhas jovens, e similares) ou cDNAs derivados de tais RNAs; características de expressão dos genes candidatos são avaliadas; genes avaliados como sendo expressos de maneira específica de folha madura são especificados com base nos resultados de avaliação; e a sequência de nucleotídeos da região a montante de 5' de cada gene candidato é identificada com base em cDNA ou DNA genômico do gene especificado relevante. Aqui, a análise de expressão de gene pode ser realizada com o uso de técnicas de análise meticulosa de expressão de gene conhecidas por uma pessoa versada na técnica, como um chip de DNA e um método de exibição diferencial.

[00037] Especificamente, a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1 existe na região a montante de 5' do gene (doravante no presente documento referida como "ecc0002") que é especificamente expressa em folhas maduras de cana-de-açúcar. Exemplos de plantas de "cana-de-açúcar" descritas no presente documento incluem, sem limitação particular a, plantas que pertencem ao gênero *Saccharum*, como *Saccharum officinarum*, *Saccharum sinense*, *Saccharum barberi*, *Saccharum robustum*, *Saccharum spontaneum*, *Saccharum edule*, e *Saccharum spp.* híbridos cv. NiF8; e plantas que pertencem a um gênero/espécie estreitamente relacionado ao gênero *Saccharum* espécie, como *Sorghum*, com *Saccharum spp.* híbridos cv. NiF8 são preferenciais.

[00038] O DNA na região a montante de 5' pode ser isolado por um

método conhecido pela pessoa versada na técnica sem limitação particular. Por exemplo, o DNA pode ser isolado por uma técnica convencional que compreende clonar uma região desconhecida, que é a região a montante de 5' no presente documento, com base na sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 4) do gene ecc0002. Em tal método, o DNA genômico que contém a região a montante de 5' do gene ecc0002 é submetido a tratamento de enzima de restrição de modo que um adotante que consiste em uma sequência de nucleotídeos predeterminada é ligada ao DNA. Iniciadores são designados para a sequência de nucleotídeos do gene ecc0002 e o adaptador, seguido por PCR. Consequentemente, uma sequência de nucleotídeos desconhecida adjacente à região a montante de 5' da sequência de nucleotídeos do gene ecc0002 pode ser amplificada. Após a sequência de nucleotídeos amplificada ser determinada, outro par de iniciadores é designado com base na sequência de nucleotídeos determinada. Assim, outra sequência de nucleotídeos desconhecida adjacente à sequência de nucleotídeos determinada pode ser amplificada de maneira similar. Esse método pode ser realizado com o uso de um kit de clonagem comercialmente disponível, como o kit RightWalk® (BEX Co., Ltd.). Além disso, um método à base de PCR inverso pode ser implantado. Em tal caso, um par de iniciadores é designado com base nas informações de sequência de nucleotídeos do gene ecc0002. PCR é realizado com o uso do par de iniciadores e um fragmento de DNA genômico obtido por meio de tratamento com certa enzima de restrição e autoligação. Assim, a região a montante do gene ecc0002 pode ser amplificada. Adicionalmente, outro método para isolar a região a montante do gene ecc0002 de uma biblioteca de DNA genômico pode ser sugerida. Em tal caso, uma biblioteca de DNA genômico que foi preparada em conformidade com a técnica convencional é triada com o uso de cDNA que compreende o gene ecc0002 como uma sonda para

obter DNA genômico que compreende o gene ecc0002. Então, a sequência de nucleotídeos de DNA genômico obtido por triagem é determinada. Consequentemente, a região a montante de 5' presente na região a montante do gene ecc0002 pode ser especificada. Adicionalmente, a região a montante de 5' pode ser seletivamente amplificada por PCR ou outros meios.

[00039] Conforme descrito acima, sequências de nucleotídeos desconhecidas localizadas a montante do gene ecc0002 são sequencialmente amplificadas ou triadas para determinar a sequência de nucleotídeos em conformidade com a técnica convencional. Consequentemente, a sequência de nucleotídeos, conforme mostrado na SEQ ID NO: 1, pode ser especificada. Uma vez que a sequência de nucleotídeos, conforme mostrado na SEQ ID NO: 1, seja determinada, torna-se possível obter a sequência de nucleotídeos, conforme mostrado na SEQ ID NO: 1 por PCR com o uso de DNA genômico extraído de cana-de-açúcar como um modelo e iniciadores designados com base na sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 1.

[00040] A sequência de nucleotídeos, conforme mostrado na SEQ ID NO: 1, funciona como uma região reguladora de expressão de gene com capacidade para induzir expressão de gene especificamente em folhas maduras. Uma região reguladora de expressão de gene contém sequências de nucleotídeos envolvidas em controle de transcrição de gene, como uma região de promotor, uma região de intensificador, uma TATA box, e/ou uma CAT box (embora os teores da região não sejam particularmente limitados aos mesmos).

[00041] O termo "especificamente" usado no presente documento refere-se às condições a seguir: uma função induzível por expressão de gene está exclusivamente presente no tecido de folha madura dentre vários tipos de tecidos que constituem uma planta; e a função induzível

por expressão de gene no tecido de folha madura é notável, estatística ou significativamente maior (por exemplo, cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais vezes maior) do que a função induzível por expressão de gene em tecidos diferentes do tecido de folha madura (por exemplo, um tecido de folha jovem, seiva de talo, epiderme de talo, raiz ou meristema).

[00042] O termo "folha madura" usado no presente documento refere-se a uma folha que contém cloroplastos que se acumulam nas células para a fotossíntese e tem, assim, uma cor verde. O mesmo também se refere a uma folha diferente de uma folha jovem que não contém nenhum cloroplasto para a fotossíntese.

[00043] Uma função induzível por expressão de gene pode ser confirmada por ensaio repórter ou outros meios conhecidos por um versado na técnica. Mediante o ensaio repórter, um vetor é preparado no qual vários genes repórteres (por exemplo, o gene da  $\beta$ -glucuronidase (GUS), o gene da luciferase (LUC) e o gene de proteína fluorescente verde (GFP)) são ligados à região a jusante de uma sequência de nucleotídeo a ser examinada em termos da função induzível por expressão de gene. A introdução de gene (ou introdução de gene transiente) no genoma de um hospedeiro é executada com o uso do vetor. Então, o nível de expressão de cada gene repórter é determinado. Assim, a função induzível por expressão de gene pode ser confirmada. O gene repórter não é particularmente limitado, desde que a expressão do mesmo seja detectável. Os exemplos de tal gene repórter incluem genes repórteres convencionalmente usados por um versado na técnica tal como o gene CAT, o gene lacZ, o gene da luciferase (doravante denotada por "LUC"), o gene da  $\beta$ -glucuronidase (doravante denotada por "GUS") e o gene de proteína fluorescente verde (doravante denotada por "GFP").

[00044] O nível de expressão de gene repórter pode ser determinado

por um método conhecidos por um versado na técnica, dependendo do tipo de gene repórter. Quando o gene repórter é o gene CAT, por exemplo, o nível de expressão de gene repórter pode ser determinado detectando-se a acetilação de cloranfenicol com o produto de gene. O nível de expressão de gene repórter pode ser determinado pela técnica a seguir. Quando o gene repórter é o gene lacZ, o desenvolvimento de cor de um composto de corante induzido pela ação catalítica do produto de expressão de gene é detectado. Quando o gene repórter é o gene LUC, a emissão de fluorescência de um composto fluorescente induzido pela ação catalítica do produto de expressão de gene é detectada. Quando o gene repórter é o gene GFP, a emissão de fluorescência da proteína GFP é detectada. Quando o gene repórter é GUS, por exemplo, a atividade de GUS é determinada como sendo uma atividade de promotor em uma célula hospedeira em concordância com: (i) um método que envolve marcação histoquímico para GUS (EMBO J. 6, 3.901 a 3.907, 1987) e/ou (ii) o método de Castle & Morris que envolve o uso de um substrato fluorescente (Plant Molecular Biology Manual, B5, 1 a 16, 1994; S. B. Gelvin & R. A. Schilperoort, Kluwer Academic Publishers). Ademais, a quantidade da proteína é determinada pelo método de Bradford (Anal. Biochem. 72, 248 a 254, 1976) e a atividade de GUS é convertida com base na quantidade da proteína em unidades de nmol 4-MU/min/mg de proteína. Assim, a função induzível por expressão de gene pode ser confirmada.

[00045] Quando um gene diferente do acima é usado como um gene repórter, adicionalmente, o nível de transcrição de gene é determinado por hibridização Northern, RT-PCR, tecnologia de arranjo de DNA ou outros meios. Alternativamente, o nível de expressão da proteína codificada pelo gene é determinado por eletroforese tal como SDS-PAGE, transferência por Western blotting ou outros meios.

[00046] O DNA regulador de expressão de gene da presente

invenção não é limitado à sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 1. Conforme descrito em (b) acima, o mesmo pode ser uma sequência de nucleotídeos que tem deleção, substituição, adição ou inserção de um ou uma pluralidade de nucleotídeos na sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 1, desde que o mesmo tenha uma atividade de promoção da expressão de gene especificamente em folhas maduras.

[00047] Por exemplo, mesmo uma sequência de nucleotídeos que tem uma deleção, uma substituição, uma adição ou uma inserção de 1 a 100 nucleotídeos, de preferência 1 a 50 nucleotídeos e de maior preferência 1 a 10 nucleotídeos na sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 1 é incluída no DNA regulador de expressão de gene da presente invenção, desde que o mesmo exiba uma atividade de promoção da expressão de gene em folhas maduras.

[00048] Adicionalmente, o DNA regulador de expressão de gene da presente invenção não é limitado ao DNA que consiste na sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 1. Conforme descrito em (c) acima, o mesmo pode ser uma sequência de nucleotídeos que tem 80% ou maior, de maior preferência 90% ou mais, de preferência adicional 95% ou mais e de preferência máxima 99% ou mais de identidade de sequência para a sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 1, desde que o mesmo exiba uma atividade de promoção da expressão de gene especificamente em folhas maduras. As sequências de nucleotídeos podem ser comparadas em concordância com uma técnica convencional. A comparação pode ser realizada com o uso de, por exemplo, BLAST (Ferramenta Básica de Busca de Alinhamentos Locais do Centro Nacional para Informações Biológicas nos EUA) na configuração padrão.

[00049] Ademais, o DNA regulador de expressão de gene da presente invenção não é limitado ao DNA que consiste na sequência de

nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 1. Conforme descrito em (d) acima, o mesmo pode ser uma sequência de nucleotídeos que hibridiza sob condições severas ao DNA que consiste em uma sequência complementar à sequência de nucleotídeos conforme mostrada na SEQ ID NO: 1, desde que o mesmo exiba uma atividade de promoção da expressão de gene especificamente em folhas maduras.

[00050] Em "condições severas", de acordo com a presente invenção, um assim chamado híbrido específico é formado, mas um híbrido não específico não é formado. Por exemplo, a hibridização é realizada em uma solução contendo 2-6 x SSC (composição 1 x SSC: 0,15 M de NaCl, 0,015 M de citrato de sódio, pH 7,0) e 0,1% a 0,5% SDS a 42 °C a 55 °C, e lavagem é realizada em uma solução contendo 0,1 a 0,2 x SSC e 0,1% a 0,5% SDS a 55 °C a 65 °C.

[00051] Ademais, o DNA regulador de expressão genética da presente invenção pode ser um fragmento de DNA que tem eliminação de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 ou mais nucleotídeos consecutivos a partir da terminação 5' e/ou terminação 3' na sequência de nucleotídeo conforme mostrado na SEQ ID NO: 1, desde que o mesmo exiba atividade de promover expressão genética especificamente em folhas maduras. Os nucleotídeos podem ser eliminados através de um método conhecido por uma pessoa versada na técnica (por exemplo, tratamento de enzima de restrição ou PCR). O fragmento de DNA pode ser uma região promotora do DNA regulador de expressão genética da presente invenção. Uma região promotora de um DNA regulador de expressão genética predeterminado pode ser pesquisada para usar uma ferramenta de análise de promotor conhecida por uma pessoa versada na técnica (por exemplo, Bioinformatics and Molecular Analysis Section (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>); Prestridge, D. S., 1995,



Predicting Pol II Promoter Sequences Using Transcription Factor Binding Sites, J. Mol. Biol. 249: 923-32). Um exemplo de tal fragmento da sequência de nucleotídeo conforme mostrado na SEQ ID NO: 1 é um DNA que consiste da posição 869 a 1119 de nucleotídeos da sequência conforme mostrado na SEQ ID NO: 1. A função induzível de expressão genética do fragmento obtido pode ser investigada através do ensaio de repórter acima ou outros meios.

[00052] Uma vez que a sequência de nucleotídeo do DNA regulador de expressão genética da presente invenção for determinada, se torna possível obter o DNA regulador de expressão genética da presente invenção através de síntese química, PCR com o uso de DNA genômico como um modelo, ou hibridização com o uso de um fragmento de DNA que tem a sequência de nucleotídeo como uma sonda. Além disso, uma sequência de nucleotídeo que tem uma mutação na sequência de nucleotídeo, conforme mostrado na SEQ ID NO: 1 pode ser sintetizada através de mutagênese de sítio direcionado ou outros meios. A mutação pode ser introduzida na sequência de nucleotídeo, conforme mostrado na SEQ ID NO: 1 através de uma técnica convencional, tal como o método Kunkel ou o método duplo Gapped, ou uma técnica de acordo com os mesmos. Por exemplo, a mutação pode ser introduzida com o uso de um kit de mutagênese com o uso de mutagênese de sítio direcionado (por exemplo, Mutante-K ou Mutante-G (TAKARA Bio)) ou um kit em série de Mutagênese de LA PCR *in vitro* (TAKARA Bio).

[00053] Subsequentemente, o gene de indução à formação de botão de flor é descrito.

[00054] O termo "gene de indução à formação de botão de flor" usado no presente documento refere-se a um gene que codifica uma proteína que tem atividade de promover formação de botão de flor ou emergência de espiga de uma planta e é associado com formação de botão de flor ou emergência de espiga de uma planta.

[00055] Os genes de indução à formação de botão de flor são conhecidos, e tais genes já foram identificados como o gene FT ou o gene OsHd3a em *Arabidopsis thaliana* ou *Oryza sativa* (JP 2000-139250 A, JP 2002-511270 A, JP 2002-153283 A, Kardailsky, I. et al., conforme acima, Kojima, S. et al., conforme acima). Esses genes podem ser usados na presente invenção. Os genes de indução à formação de botão de flor podem ser pesquisados a partir de bancos de dados disponíveis ao público (por exemplo, GenBank). Por exemplo, a sequência de nucleotídeo do gene Hd3a derivada a partir do grupo *Oryza sativa Japonica* (Figura 4, SEQ ID NO: 6) e a sequência de aminoácido do mesmo (Figura 4, SEQ ID NO: 7) são registrados sob o número de acesso AB052944.1 com o GenBank.

[00056] Os genes de indução à formação de botão de flor podem ser obtidos através de uma técnica de clonagem, que é bem conhecida no campo de biologia molecular. Por exemplo, uma biblioteca de genoma derivado de planta ou uma biblioteca de cDNA pode ser triada com o uso de sondas ou iniciadores projetados com base em sequências gene conhecidas (por exemplo, a sequência registrada sob o número de acesso AB052944.1 com GenBank). Um gene derivado de uma planta com informações de sequência desconhecidas pode ser obtido através de triagem de uma biblioteca genômica ou uma biblioteca cDNA derivada da planta com o uso de sondas ou iniciadores projetados com a utilização de um gene de planta com uma sequência conhecida. Mediante isolamento de sequência, o DNA é amplificado por uma técnica de amplificação padrão, tal como reação de cadeia de polimerase (PCR), e os genes (DNAs) podem ser obtidos em quantidades adequadas para transformação (isto é, transferência de gene).

[00057] Preferencialmente, o gene de indução à formação de botão de flor compreende DNA que codifica um polipeptídeo selecionado a partir dos polipeptídeos (e) a (g) abaixo:

(e) um polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácido, conforme mostrado na SEQ ID NO: 7;

(f) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido que têm eliminação, substituição, adição ou inserção de 1 ou uma pluralidade de aminoácidos na sequência de aminoácido, conforme mostrado na SEQ ID NO: 7 e que tem atividade de promover formação de botão de flor ou emergência de espiga; e

(g) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido que tem 90% ou mais identidade de sequência com a sequência de aminoácido, conforme mostrado na SEQ ID NO: 7 e que tem atividade de promover formação de botão de flor ou emergência de espiga.

[00058] A sequência de aminoácido, conforme mostrado na SEQ ID NO: 7 é uma sequência de aminoácido da proteína Hd3a derivada do arroz.

[00059] Na presente invenção, um polipeptídeo codificado pelo o gene de indução à formação de botão de flor não é limitado a um polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácido conforme mostrado na SEQ ID NO: 7. Conforme descrito em (f) acima, tal polipeptídeo pode consistir em uma sequência de aminoácido que tem eliminação, substituição, adição ou inserção de 1 ou uma pluralidade de aminoácidos na sequência de aminoácido conforme mostrado na SEQ ID NO: 7 e tem atividade de promover formação de botão de flor ou emergência de espiga.

[00060] Por exemplo, uma sequência de aminoácido que tem eliminação, substituição, adição ou inserção de 1 a 20, preferencialmente 1 a 10, e mais preferencialmente 1 a 5 aminoácidos na sequência de aminoácido conforme mostrado na SEQ ID NO: 7 pode ser utilizada na presente invenção, contanto que a mesma tenha atividade de promoção de formação de botão de flor.

[00061] Na presente invenção, um polipeptídeo codificado pelo gene de indução à formação de botão de flor não é limitado a um polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácido conforme mostrado na SEQ ID NO: 7. Conforme descrito em (g) acima, a mesma pode ser uma sequência de aminoácido que tem 80% ou mais, mais preferencialmente 90% ou mais, adicionalmente preferencialmente 95% ou mais, e a mais preferencialmente 99% ou mais de identidade de sequência em relação à sequência de aminoácido conforme mostrado na SEQ ID NO: 7, contanto que a mesma tenha atividade de promoção de formação de botão de flor. Sequências de nucleotídeos podem ser comparadas como uso, por exemplo, da BLAST nos ajustes padrões, conforme descrito acima.

[00062] Um exemplo de tal gene de indução à formação de botão de flor é DNA que consiste na sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 2. O DNA que consiste na sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 2 codifica a proteína Hd3a derivada de arroz.

[00063] O gene de indução à formação de botão de flor de acordo com a presente invenção não é limitado a um gene que consiste na sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 2. Tal gene pode ser um gene que consiste em uma sequência de nucleotídeos que tem eliminação, substituição, adição ou inserção de 1 ou uma pluralidade de nucleotídeos na sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 2, contanto que a mesma codifique uma proteína que tem a atividade de promoção de formação de botão de flor ou emergência de espiga.

[00064] Por exemplo, uma sequência de nucleotídeos que tem eliminação, substituição, adição ou inserção de 1 a 50 nucleotídeos e preferencialmente 1 a 10 nucleotídeos na sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 2 pode ser utilizada na presente

invenção, contanto que a mesma codifique uma proteína que tem a atividade de promoção de formação de botão de flor.

[00065] O gene de indução à formação de botão de flor de acordo com a presente invenção não é limitado a um gene que consiste na sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 2. A mesma pode ser uma sequência de nucleotídeos que tem 80% ou mais, mais preferencialmente 90% ou mais, adicionalmente preferencialmente 95% ou mais, e a mais preferencialmente 99% ou mais identidade de sequência em relação à sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 2, contanto que a mesma codifique uma proteína que tem a atividade de promoção de formação de botão de flor ou emergência de espiga. Sequências de nucleotídeos podem ser comparadas com uso, por exemplo, da BLAST nos ajustes padrões, conforme descrito acima.

[00066] Além disso, o gene de indução à formação de botão de flor de acordo com a presente invenção não é limitado a um gene que consiste na sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 2. Contanto que a mesma codifique uma proteína que tem a atividade de promoção de formação de botão de flor ou emergência de espiga, a mesma pode ser uma sequência de nucleotídeos que hibridiza em condições severas para o DNA que consiste em uma sequência complementar à sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 2.

[00067] As "condições severas" são conforme descrito acima.

[00068] Subsequentemente, um vetor recombinante que compreende o DNA regulatório de expressão de gene e o gene de indução à formação de botão de flor é descrito.

[00069] O vetor recombinante da presente invenção pode ser construído introduzindo-se o DNA que compreende o gene de indução à formação de botão de flor ligado de modo operável ao DNA regulatório

de expressão de gene acima em um vetor apropriado. O termo "ligado de modo operável" utilizado no presente documento se refere a condições em que o vetor acima contém o DNA regulatório de expressão de gene e o gene de indução à formação de botão de flor ligado entre si, de modo que o gene de indução à formação de botão de flor é corretamente expressado sob a regulação do DNA regulatório de expressão de gene em uma célula hospedeira transfectada com o vetor acima. O DNA regulatório de expressão de gene e o gene de indução à formação de botão de flor podem ser "ligados" entre si direta ou indiretamente por meio de um espaçador com um comprimento adequado e uma sequência adequada. Preferencialmente, o DNA regulatório de expressão de gene é ligado ao gene de indução à formação de botão de flor com o uso de "ATG" localizado na terminação 3' da sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 1 como "ATG" que codifica a primeira do gene de indução à formação de botão de flor. Um exemplo de tal DNA inclui um DNA que consiste na sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 3 em que o DNA regulatório de expressão de gene é ligado ao gene de indução à formação de botão de flor com o uso de "ATG" localizado na terminação 3' da sequência de nucleotídeos conforme mostrado na SEQ ID NO: 1 como "ATG" localizado na terminação 5' da SEQ ID NO: 2.

[00070] Os exemplos de vetores que podem ser, preferencialmente, usados na presente invenção incluem os vetores pBI, vetores pBII, vetores pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P.: The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation, Plant Mol. Biol., 25: 989 a 994, 1994), vetores pCAMBIA ([http://www.cambia.org/main/r\\_et\\_camvec.htm](http://www.cambia.org/main/r_et_camvec.htm)) e vetores pSMA através dos quais um gene funcional pode ser introduzido em uma planta com o uso de *Agrobacterium*. O uso dos vetores binários pBI e pBII ou vetores intermediários é particularmente preferencial e os

exemplos dos mesmos incluem os vetores pBI1221, pBI121, pBI101, pBI101.2, pBI101.3 e pIG121. Um vetor binário é um vetor carregador que pode se replicar em *Escherichia coli* e *Agrobacterium*. Quando uma planta é infectada com *Agrobacterium* que contém um vetor binário, o DNA que corresponde a uma região entre as sequências de borda (a sequência LB e a sequência RB) presentes no vetor pode ser incorporado no DNA nuclear da planta (EMBO Journal, 10 (3), 697 a 704, 1991). Em quanto isso, um gene pode ser diretamente introduzido em uma planta com o uso de um vetor pUC. Os exemplos de um vetor pUC incluem pUC18, pUC19 e pUC9. Além disso, os vetores de vírus de planta, tais como os vírus de mosaico de couve-flor (CaMV), vírus de mosaico dourado de feijão (BGMV) e vírus de mosaico de tabaco (TMV) podem ser usados.

[00071] Para facilitar a ligação e/ou inserção em um vetor, o DNA regulador de expressão de gene e/ou o gene de indução da formação de botão de flor pode ser adequadamente modificado através da substituição, inserção ou adição de uma sequência de enzima de restrição. Para a inserção em um vetor, é possível usar, por exemplo, um método que compreende a clivagem do DNA purificado que compreende o DNA regulador de expressão de gene e o gene de indução à formação de botão de flor com uma enzima de restrição adequada e inserindo cada fragmento obtido no sítio de reconhecimento de enzima de restrição ou no sítio de múltiplas clonagens do DNA de vetor adequado para a ligação ao vetor.

[00072] Se for necessário, um intensificador, um íntron, um sinal de adição poli-A, uma sequência 5'-UTR, um gene marcador de seleção ou similares podem ser ligados a um sítio a montante, no interior ou a jusante o DNA regulador de expressão de gene e/ou gene de indução à formação de botão de flor no vetor.

[00073] Um intensificador é usado, por exemplo, para aprimorar a

eficácia de expressão dos genes de indução à formação de botão de flor. Um exemplo dos mesmos é uma região de intensificador que contém uma sequência localizada a montante em um promotor CaMV35S.

[00074] Um terminador pode ser uma sequência que pode terminar a transcrição de um gene gerada pelo promotor acima. Os exemplos do mesmo incluem um terminador de gene de nopalina sintase, um terminador de gene de octopina sintase e um terminador de gene RNA de CaMV 35S.

[00075] Os exemplos de um gene marcador de seleção incluem um gene resistente à higromicina, um gene resistente à canamicina, um gene resistente aos bialafos, um gene resistente à blasticidina S e um gene de acetolactato sintase. Um gene marcador de seleção pode ser ligado juntamente com um gene de indução à formação de botão de flor para um plasmídeo idêntico conforme descrito acima para a preparação de um vetor recombinante. Alternativamente, um vetor recombinante obtido através da ligação de um gene marcador de seleção a um plasmídeo e um vetor recombinante obtido através da ligação de um gene de indução à formação de botão de flor a um plasmídeo podem ser preparados separadamente. Quando os mesmos são preparados separadamente, um hospedeiro é co-transfectado com ambos os vetores.

[00076] Um transformante pode ser produzido com o uso do vetor recombinante, assim, preparado.

[00077] Quando uma planta transformada é preparada, vários métodos que foram reportados e estabelecidos podem ser adequadamente usados. Os exemplos preferenciais de tais métodos incluem um método de *Agrobacterium*, um método de fosfato cálcico de PEG, um método de eletroporação, um método de lipossomo, um método arma de partícula e um método de microinjeção. O método de



*Agrobacterium* é executado com o uso de um protoplasto, uma seção de tecido ou uma planta em si (isto é, um método *in planta*). Quando um protoplasto é usado, tal protoplasto é submetido à co-cultura com *Agrobacterium* que tem um plasmídeo de Ti ou à fusão com esferoplasto de *Agrobacterium* (isto é, um método de esferoplasto). Quando uma seção de tecido é usada, uma seção de folha de cultura asséptica (disco de folha) ou calos de uma planta-alvo podem ser infectados com *Agrobacterium*. Quando um método *in planta* que envolve o uso de uma semente ou planta (isto é, um sistema que não realiza cultura de tecido com a adição de um hormônio de planta) é empregado, as sementes de absorção de água, uma planta jovem (muda jovem), uma planta em vaso e similares podem ser diretamente tratadas com *Agrobacterium*.

[00078] A possibilidade de um DNA que compreende o DNA regulador de expressão de gene e p gene de indução à formação de botão de flor ter sido incorporado em uma planta pode ser confirmada através de PCR, hibridização Southern, hibridização Northern, Western blotting, ou outros conjuntos de procedimentos. Por exemplo, o DNA é preparado a partir de uma planta transformada, os iniciadores específicos de DNA são projetados e o PCR é, então, executado. Em seguida, um produto de amplificação é submetido à eletroforese em gel de agarose, eletroforese em gel de poliacrilamida, eletroforese capilar ou outro meio, seguido pela coloração com brometo de etídio, líquido Verde de SYBR ou similares. Detectando-se um produto de amplificação sob a forma de uma única banda, a transformação de planta pode ser confirmada. Além disso, um produto de amplificação pode ser detectado por PCR com o uso de iniciadores identificados preliminarmente com um corante de fluorescência ou similares. Ademais, o produto amplificado pode se ligar a uma fase sólida, tal como uma microplaca e o produto ampliado pode, então, ser detectado através, por exemplo, de uma reação de enzima ou fluorescência.

[00079] Os exemplos de plantas usadas para a transformação na presente invenção incluem, não sem limitações específicas, plantas que pertencem às famílias *Gramineae*, *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Leguminosae*, *Rosaceae*, *Asteraceae*, *Liliaceae*, *Apiaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cucurbitaceae*, *Convolvulaceae* e *Chenopodiaceae*. Os exemplos preferenciais dos mesmos incluem plantas que pertencem à família *Gramineae*, tal como cana de açúcar, arroz, cevada, trigo, milho, *Sorghum*, painço, painço japonês, erva de Napier e painço amarelo.

[00080] Os exemplos dos materiais de planta submetidos à transformação na presente invenção incluem tecido de planta da raiz, talo, folha, semente, embrião, óvulo, ovário, ápice de muda (um ponto de crescimento na ponta de um broto de planta), antera, pólen, ou similares, uma seção desse tecido de planta, calo não diferenciado, e células de planta cultivadas como protoplastos obtidos submetendo-se os exemplos acima ao tratamento enzimático para remoção de parede celular. Quando um método *em planta* é empregado, adicionalmente, sementes absorvedoras de água e um corpo de planta completo podem ser usados.

[00081] O termo "planta transformada" utilizado na presente invenção se refere a um corpo de planta completo, um órgão de planta (por exemplo, uma raiz, talo, folha, pétala, semente ou fruto), um tecido de planta (por exemplo, epiderme, floema, parênquima, xilema, ou feixe vascular), ou uma célula de cultura de planta.

[00082] Quando células de cultura de planta são utilizadas, um órgão de planta ou uma própria planta pode ser regenerada por um método de cultura conhecido, com a finalidade de regenerar uma planta transformada a partir das células transformadas obtidas. Uma pessoa versada na técnica pode implantar prontamente esse procedimento de acordo com uma técnica convencional para regeneração de uma planta a partir de células de planta. Por exemplo, uma planta pode ser regenerada a partir de células de planta na forma descrita abaixo.

[00083] Quando um tecido de planta ou protoplasto é utilizado como um material de planta alvo para a transformação, o mesmo é cultivado em um meio de formação de calo esterilizado complementado com elementos inorgânicos, vitaminas, uma fonte de carbono, açúcar utilizado com uma fonte de energia, um regulador de crescimento de planta (por exemplo, um hormônio de planta como auxina ou citocina), e similares para a formação de um calo indiferenciado que tem a capacidade de crescer adventicamente (doravante denominado "indução de calo"). O calo assim formado é transferido para um meio fresco que contém um regulador de crescimento de planta como auxina para crescimento adicional (subcultura).

[00084] A indução é executada em um meio sólido como ágar. A subcultura é executada por meio de, por exemplo, cultura líquida. Nesse caso, cada cultura pode ser executada de forma eficaz e em uma larga escala. Subsequentemente, o calo crescido através da subcultura descrita acima é cultivado sob condições adequadas para a indução de rediferenciação de órgão (doravante denominada "indução de rediferenciação"). Isso resulta eventualmente na regeneração de uma planta completa. A indução de rediferenciação pode ser realizada determinando-se os tipos e quantidades de um regulador de crescimento de planta, como auxina ou citocinina, e componentes diferentes, como uma fonte de carbono, para ser adicionada a um meio, e ajustar adequadamente luz, temperatura, e outras condições. Essa indução de rediferenciação resulta na formação de um embrião, raiz, broto, talo, folha, ou similares adventícios, seguido pela cultura adicional de uma planta completa. Alternativamente, um produto rediferenciado pode ser preservado no estado que está antes do mesmo ser tornar uma planta completa (por exemplo, como uma semente artificial encapsulada, embrião seco, ou célula ou tecido de liofilização ou).

[00085] De acordo com a presente invenção, o termo "planta transformada" se refere a uma "planta de geração T1" obtida como uma planta de primeira geração após a transformação. O termo também se refere a uma "planta de geração T2" obtida como uma planta da geração subsequente de sementes da planta de geração T1 e uma planta de progênie como uma planta de próxima geração (geração T3) obtida por meio de autopolinização de uma flor de uma planta de "geração T2", a qual observou-se ser uma planta transgênica por meio de, por exemplo, seleção de fármaco ou análise Southern.

[00086] A então produzida planta transformada expressa o gene indutor de formação de botão de flor especificamente em folhas maduras.

[00087] Na planta transformada de acordo com a presente invenção, a formação de botão de flor ou surgimento de espiga é promovida, e a diferenciação e/ou formação de botões de flor ou órgãos de flor, surgimento de espiga, e/ou floração acontecem mais cedo do que os mesmos em plantas de tipo selvagem. Especificamente, o período de semeadura para o surgimento de espiga e/ou floração da planta transformada de acordo com a presente invenção é mais curto do que o mesmo das plantas de tipo selvagem.

[00088] Na planta transformada de acordo com a presente invenção, além disso, a ramificação é promovida, e a ramificação acontece mais cedo e/ou o número de ramificação aumenta além do mesmo em plantas de tipo selvagem.

[00089] O DNA de acordo com a presente invenção que compreende o DNA regulador de expressão de gene que tem a atividade promover a expressão de gene especificamente em folhas maduras e o gene indutor de formação de botão de flor tem a função de promover o surgimento de espiga e/ou ramificação das plantas, e em particular, plantas de cana de açúcar e plantas intimamente relacionadas às

mesmas. O DNA de acordo com a presente invenção tem a capacidade de induzir o surgimento de espiga em uma variedade de planta que geralmente não é passa pelo surgimento de espiga, encurtando o período até o surgimento de espiga, encurtando o período até a ramificação, e/ou aumentando o número de ramificação. Por conta dos recursos conforme descritos acima, o número de ramificação que tem a capacidade de surgimento de espiga; isto é, o número de ramificação efetivo, pode ser aumentado em uma planta transformada na qual o DNA de acordo com a presente invenção foi introduzido. Portanto, a reprodução cruzada pode ser executada de forma eficaz, independentemente do tempo necessário para o surgimento de espiga e a capacidade para o surgimento de espiga. Além disso, uma planta transformada na qual o DNA de acordo com a presente invenção foi introduzido tem um tempo de geração que é  $1/2$  a  $1/5$ , e de preferência  $1/3$ , daquele de uma planta de tipo selvagem. Isso pode acentuar a eficácia para a reprodução cruzada.

## **EXEMPLOS**

[00090] Posteriormente, a presente invenção é descrita em maiores detalhes com referência aos exemplos, embora o escopo técnico da presente invenção não seja limitado a esses exemplos.

### [Exemplo 1] Clonagem de gene específico de folha madura

[00091] O RNA total foi extraído e purificado de tecidos de folha madura, folha jovem e talo de cana-de-açúcar (*Saccharum spp. cv. NiF8*) que usam RNeasy Plant Mini Kits (QIAGEN). Uma biblioteca de cDNA foi construída de acordo com uma técnica convencional e usada para análise de expressão de gene. A análise de expressão de gene foi realizada com o uso de um Arranjo de Genoma de Cana-de-Açúcar (Affimetrix) de acordo com as instruções do fabricante.

[00092] Como um resultado da análise de expressão de gene, um gene expresso em um nível particularmente alto em folhas maduras de

*Saccharum spp. cv. NiF8* foi identificado e designado como o gene "ecc0002". A sequência de nucleotídeos do gene ecc0002 derivado de *Saccharum spp. cv. NiF8* é idêntica à sequência de nucleotídeos de EST ecc0002 derivado de *Saccharum officinarum* mostrada na Figura 1. O RNS foi extraído e purificado a partir de folhas maduras, folhas jovens, medula de talo, epiderme de talo, raízes e meristema de *Saccharum spp. cv. NiF8*. O cDNA foi preparado de acordo com uma técnica convencional. O nível de expressão de gene ecc0002 em cada tecido foi analisado através de um método SYBRGreen que usa um sistema PCR em tempo real ABI7500 (Applied Biosystems).

[00093] A Figura 2 mostra os resultados (em que o maior nível de expressão de gene em folhas maduras é designado como 100%). Os resultados revelaram que a expressão do gene ecc0002 é fortemente induzida em folhas maduras de *Saccharum spp. cv. NiF8*.

#### [Exemplo 2] Aquisição de promotor específico de folha madura

[00094] O DNA genômico (aproximadamente 300 ng) foi extraído e purificado a partir de 0,5 g de tecido de folha madura de cana-de-açúcar (*Saccharum spp. cv. NiF8*) que usa DNeasy Plant Mini Kits (QIAGEN). A região reguladora de expressão de gene localizada a montante 5' do gene ecc0002 gene foi obtida a partir do DNA genômico acima com base na sequência de nucleotídeos do gene ecc0002 obtido no Exemplo 1 que usa RightWalk Kits (BEX Co., Ltd.). Uma sequência de reconhecimento de enzima de restrição *HindIII* (AAGCTT) e uma sequência de reconhecimento de enzima de restrição *BlnI* (CCTAGG) foram usadas como sequências de ligante. O anterior foi introduzido no 5'-terminal da região reguladora de expressão de gene obtida e o último foi introduzido no lado 3' do local de iniciação de tradução (ATG) do gene ecc0002 localizado no 3'-terminal da região reguladora de expressão de gene. Desse modo, o DNA que codifica a região reguladora de expressão do gene ecc0002 foi preparado (Figura 3)

(SEQ ID NO: 5).

[00095] A sequência de DNA acima foi analisada com o uso de uma ferramenta de análise de promotor convencional (Bioinformatics e Molecular Analysis Section) (<http://www.bimas.cit.nih.gov/mol-bio/proscan/>). Como um resultado, presumiu-se que uma região que serve como um promotor existe na região que compreende os nucleotídeos 875th a 1.125th na SEQ ID NO: 5.

[Exemplo 3] Construção de vetor de expressão de gene  $\beta$ -glucuronidase

[00096] Um vetor de expressão de gene que compreende o DNA que codifica a região reguladora de expressão de gene obtida no Exemplo 2 ligada ao UidA cDNA que codifica o gene  $\beta$ -glucuronidase (GUS) foi construído. Um vetor de transformação de planta (pBII221) foi usado para o vetor de expressão de gene. O DNA que codifica uma região reguladora de expressão de gene foi ligado ao UidA cDNA de tal maneira que a sequência ATG codifica a primeira metionina localizada no lado 5'- do UidA cDNA se alinharia com a sequência ATG que codifica a primeira metionina do gene ecc0002 gene localizado no lado 3'-terminal do DNA que codifica uma região reguladora de expressão de gene (tipo de fusão de tradução). A Figura 5 mostra esquematicamente o vetor de expressão de gene.

[Exemplo 4] Produção de planta recombinante de gene de expressão GUS

[00097] O vetor de expressão de gene produzido no Exemplo 3 foi introduzido em uma planta hospedeira (*Saccharum spp.* cv. NiF8) pelo método *Agrobacterium*. Desse modo, uma cana-de-açúcar transgênica na qual a expressão de gene GUS foi regulada pelo DNA de regulação de expressão do gene ecc0002 foi produzida.

[00098] O RNA foi extraído e purificado a partir de folhas maduras, folhas jovens, medula de talo, epiderme de talo, raízes e meristema da cana-de-açúcar transgênica. O cDNA foi preparado de acordo com uma técnica convencional. O nível de expressão de gene GUS em cada

tecido foi analisado por um método SYBRGreen que usa um sistema PCR de tempo real ABI7500 (Applied Biosystems).

[00099] Para comparação, os níveis de expressão de gene GUS em folhas maduras e folhas jovens da cana-de-açúcar transgênica na qual a expressão de gene GUS foi regulada por um promotor de vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) 35S e o nível de expressão de GUS no meristema de cana-de-açúcar não transgênica (controle) foram analisados da maneira acima.

[000100] A Figura 6 mostra os resultados. Os níveis de expressão dos tecidos individuais são expressos em valores relativos em referência ao nível de expressão de gene GUS mais alto confirmado em tecidos de folhas maduras dentre os tecidos analisados de cana-de-açúcar transgênica (nas quais a expressão de gene GUS foi regulada pelo DNA de regulação de expressão de gene ecc0002), que foi designado como 100%.

[000101] Os resultados acima revelaram que o DNA regulador de expressão de gene ecc0002 pode induzir a expressão de gene especificamente em folhas maduras a uma extensão aproximadamente 17 vezes maior que o nível de expressão de gene de GUS regulado por um promotor CaMV35S.

#### [Exemplo 5] Construção de vetor de expressão de gene Hd3a de arroz

[000102] Um vetor de expressão de gene que compreende DNA que codifica a região reguladora de expressão de gene obtida no Exemplo 2 ligada ao cDNA que codifica Hd3a de arroz (chamado de cDNA "Hd3a") foi construído. Um vetor de transformação de planta (pIG121-Hm) foi usado para o vetor de expressão de gene. O DNA que codifica a região reguladora de expressão de gene foi ligado ao cDNA Hd3a de tal maneira que a sequência de ATG codifica a primeira metionina localizada no lado 5'-terminal de cDNA Hd3a se alinharia com uma sequência de ATG que codifica a primeira metionina do gene ecc0002, localizada no lado 3'-terminal do DNA que codifica a região reguladora



de expressão de gene (tipo de fusão de tradução). A Figura 7 mostra a sequência que compreende o DNA que codifica a região reguladora de expressão de gene ligada ao cDNA Hd3a (SEQ ID NO: 3). Além disso, a Figura 8 mostra esquematicamente o vetor de expressão de gene.

[Exemplo 6] Produção de planta transgênica que expressa Hd3a de arroz

[000103] O vetor de expressão gênica produzido no Exemplo 5 foi introduzido em uma planta hospedeira (*Saccharum spp. cv. NiF8*) através do método de *Agrobacterium*. Dessa forma, uma linhagem de cana-de-açúcar transgênica em que expressão gênica de Hd3a de arroz seria regulada pelo DNA regulatório de expressão do gene ecc0002 foi produzido.

[000104] Para comparação, uma cana-de-açúcar do tipo selvagem e uma cana-de-açúcar transgênica em que a expressão gênica de Hd3a de arroz seria regulada por um promotor CaMV 35S foram preparados e usados.

[000105] O total de RNAs foi extraído e purificado a partir de calos, tecidos rediferenciados e folhas maduras de canas-de-açúcar transgênicas, os cDNAs foram preparados de acordo com uma técnica convencional, e os níveis de expressão gênica de Hd3a de arroz em tecidos foram analisados através do método SYBR Green com o uso do aparelho de PCR em Tempo Real ABI7500 (Applied BioSystems). Deve ser observado que o termo "tecido rediferenciado" se refere a tecido obtido através da indução de calor à rediferenciação, mas o termo não se refere a um tecido ou órgão de uma planta que foi completamente regenerada. O nível de expressão gênica de actina foi analisado da mesma maneira conforme usado para o padrão interno.

[000106] Os resultados são mostrados na Figura 9.

[000107] Os genes Hd3a de arroz que foram introduzidos nas linhagens de cana-de-açúcar transgênica em que a expressão gênica

de Hd3a de arroz seria regulada pelo DNA regulatório de expressão do gene ecc0002 foram expressados especificamente nos tecidos de folha madura rediferenciados.

[000108] Em contraste, as linhagens de cana-de-açúcar transgênicas nas quais a expressão gênica de Hd3a de arroz seriam reguladas pelo promotor CaMV 35S foram introduzidas em um meio para rediferenciação de calos recombinantes. Tais calos se tornaram marrons em aproximadamente 2 semanas, e todos os calos recombinantes morreram posteriormente. Diferentemente de outras plantas tais como *Oryza sativa* e *Arabidopsis thaliana*, concluiu-se que o gene Hd3a possui efeitos letais no estágio de rediferenciação de cana-de-açúcar.

[Exemplo 7] Capacidade de induzir emergência de espiga e ramificação em planta transgênica que expressa gene Hd3a de arroz

[000109] A capacidade de induzir emergência de espiga e ramificação em uma planta transgênica que expressa o gene Hd3a de arroz preparado no Exemplo 6 foi investigada.

[000110] Os resultados são mostrados nas Figuras 10 e 11.

[000111] Em relação à planta transgênica que expressa o gene Hd3a de arroz, a ramificação foi observada no estágio de crescimento inicial, que é aproximadamente 20 dias após a semeadura de mudas preparadas a partir de botões laterais em desenvolvimento (Figura 10), e a emergência de espiga foi observada aproximadamente 2 meses após a semeadura de mudas preparadas a partir de botões laterais em desenvolvimento (Figura 11).

[000112] Em contraste, o período de semeadura das mudas preparadas a partir de botões laterais em desenvolvimento até a observação de ramificação para plantas do tipo selvagem foi maior longo que para a planta transgênica com o uso do gene Hd3a de arroz (Figura 10), e a emergência de espiga não foi observada 3 meses após a semeadura das mudas preparadas a partir de botões laterais em

desenvolvimento (Figura 11).

[000113] Os resultados demonstram que as plantas transgênicas de cana-de-açúcar nas quais a expressão gênica de Hd3a de arroz é regulada pelo DNA regulatório de expressão do gene ecc0002 podem ser suficientemente induzidas para se submeterem à ramificação e à emergência de espiga. Além disso, tais plantas transgênicas de cana-de-açúcar são capazes de emergir a espiga adicionalmente a partir de talos ramificados, o que, por sua vez, permite a manutenção de talos de emergência de espiga por um longo período de tempo (isto é, vários meses).

#### **APLICABILIDADE INDUSTRIAL**

[000114] De acordo com a presente invenção, a emergência de espiga e/ou a ramificação podem ser promovidas em plantas e, em particular, plantas de cana-de-açúcar e plantas proximalmente relacionadas a isso. Isso permite eficiência em reprodução cruzada, independentemente do tempo necessário para emergência de espiga e da capacidade de emergência de espiga, e também concretiza um tempo de geração mais curto de uma planta. Dessa forma, a eficiência de reprodução cruzada pode ser notavelmente aprimorada. Consequentemente, espera-se que a presente invenção realize uma contribuição notável para a reprodução cruzada de plantas e, em particular, plantas de cana-de-açúcar e plantas proximalmente relacionadas a isso.

[000115] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente citados na presente invenção são incorporados na presente invenção a título de referência em sua totalidade.

## REIVINDICAÇÕES

1. DNA, caracterizado pelo fato de que consiste na sequência de nucleotídeos conforme mostrada em SEQ ID NO: 1 operavelmente ligado a uma sequência de nucleotídeos conforme mostrada em SEQ ID NO: 2 ou uma sequência de nucleotídeos degenerada da mesma que codifica a SEQ ID NO: 7,

em que o DNA direciona a expressão de uma sequência de nucleotídeo ou o nucleotídeo degenerado especificamente de uma maneira específica para folha madura e promove a formação de botão de flor ou emergência de espiga e/ou ramificação de uma planta.

2. Vetor recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende o DNA, como definido na reivindicação 1.

3. Método para produção de uma planta transformada, caracterizado pelo fato de que compreende transformar uma planta pela introdução do vetor recombinante, como definido na reivindicação 2.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a planta pertence à família *Gramineae*.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a planta pertence ao gênero *Saccharum*, *Sorghum* ou *Miscanthus*.

Fig. 1

Locus						
Contagem base	740 a	1007 c	968 g	674 t		
Origem						
1	ATCAAAC TCG	CAGCAGTAGA	GCAGCACGAG	CAACACGCGG	CGCCGCTCCA	ACCATCTCAG
61	CTTCGCGCTT	CCCGCGCCCC	GCGCGCGCGC	CCGCCATGGC	GTCCGAGCGG	CACCACTCCA
121	TCGACGCGCA	GCTCCGTGCC	CTGGCCCCCG	GCAAGGTCTC	CGAGGAGCTC	ATCCAGTACG
181	ACGCCCTGCT	CGCCGACCGT	TTCCTCGACA	TCCTCCAGGA	CCTCCATGGC	CCTAGCCTTC
241	GCGAATTTGT	CCAGGAGTGC	TACGAGGTGT	CGGCCGATTA	CGAGGGCAAG	AAGGACACGT
301	CGAAGGTGGG	CGAGCTGGGC	ACCAAGCTCA	CGGGGTGGC	GCCCGCCGAC	GCCATCCTGG
361	TGGCGAGCTC	CATCCTGCAC	ATGCTCAACC	TGGCCAACCT	GGCCGAGGAA	GTGGAGCTGG
421	CGCACCGCCG	CCGGAACAGC	AAGCTCAAGC	ACGGGGACTT	CTCCGACGAG	GGCTCCGCCA
481	CCACCGAGTC	GGACATCGAG	GAGACGCTCA	AGCGCCTCGT	GTCCGTGGGC	AAGACCCCGG
541	AGGAGGTGTT	CGAGGCGCTC	AAGAACCAGA	GCGTCGACCT	CGTCTTCACC	GCGCACCCCA
601	CGCAGTCCGC	CAGGAGGTGC	CTCCTGCAGA	AAAACGCCAG	GATCCGGAAT	TGTCTGACGC
661	AGCTGAGTGC	CAAGGACGTC	ACGGACGACG	ACAAGAAGGA	GTCCGACGAG	GCTCTGCAGA
721	GAGAGATCCA	AGCAGCTTTC	AGAACTGATG	AGATCCGGAG	AGCACAACCC	ACCCACACAG
781	ATGAAATGCG	CTATGGGATG	AGCTACATCC	ATGAAACTGT	ATGGAAGGGT	GTCCCTAAGT
841	TTTTGCGCCG	TGTGGATACA	GCCCTGAAGA	ATATCGGCAT	CAATCAGCGC	CTTCCCTACA
901	ATGTTCCCTCT	CAITTAAGTTC	TGGTCTTGGA	TGGGTGGTGA	CCGTGATGGA	AATCCAAGAG
961	TAACTCCGGA	GGTGACAAGA	GAAGTATGCT	TGCTGTCCAG	AATGACGGCT	GCAAACTTGT
1021	ACATCGATCA	GGTCGAAGAC	CTGATGTTTG	AGCTCTCTAT	GTGGCGCTGC	AATGATGAAC
1081	TTCGTGCTCG	AGCCGAAGAA	GTCCAGAGTA	CTCCAGCTTC	AAAGAAAGTT	ACCAAGTATT
1141	ACATAGAATT	CTGGAAGCAA	ATTCCCTCAA	ACGAGCCCTA	CCGGGTGATA	CTTGGTGTCT
1201	TAAGGGACAA	GTTATACAAC	ACACGCGAGC	GTGCACGCCA	TCTGCTGGCA	ACTGGATTTT
1261	CTGAAATTTT	TGTGGACTCG	GTATTTTACCA	ATATCGAAGA	GTTCCTTGAG	CCCTTTGAGC
1321	TATGCTACAA	ATCCCTGTGT	GACTGCGGGG	ACAAGGCCAT	CGCGGACGGG	AGCCTCCTGG
1381	ACCTCCTGCG	CCAGGTGTTT	ACGTTCCGGC	TCTCCCTGGT	GAAGTTGGAC	ATCCGTCAGG
1441	AGTCGGAGCG	GCACACCGAC	GTGATCGACG	CCATCACCAC	GTACCTTGGC	ATCGGGTCGT
1501	ACCGCTCGTG	GCCCGAGGAC	AAGCGGATGG	AGTGGGTGGT	GTCCGAGCTG	AAAGGCAAGC
1561	GGCCGCTGCT	GCCCCCGGAC	CTTCCCATGA	CCGAGGAGAT	CGCCGACGTC	ATCGGGGCGA
1621	TGCACGTCC	CGCGGAGCTC	CCGTCCGACA	GCTTCGGCCC	CTACATCATC	TCCATGTGCA
1681	CAGCCCCCTC	CGACGTGCTC	GCGGTGGAGC	TCCTCGACGG	CGAGTGTGGC	ATTCCGCCAG
1741	CGCTGCCCGT	GGTGCCGCTG	CTCGAGAGGC	TGGCCGACCT	GCAGGCGGGC	CCCGCGTCCG
1801	TGGAGCGGCT	CTTCTCCACT	GACTGGTACT	TCGACCACAT	CAAGGGCAAG	CACGAGGTGA
1861	TGGTCGGGTA	CTCCGACTCC	GGCAAGGACG	CCGGCCGCGT	GTCCGCGGGC	TGGCAGCTGT
1921	ACGTGGCGCA	GGAGGAGATG	GCCAAGGTGG	CCAAGAAATA	CGGCGTGAAG	CTGACCTTGT
1981	TCCACGGGCG	CGCGGGCACC	GTGGGCAGGG	GTGGCGGGCC	GACGCACCTG	GCCATCCTGT
2041	CCCAGCCGCC	GGACACCATC	AACGGGTCAA	TCCGCGTGAC	GGTGCAGGGC	GAGGTCAATC
2101	AGTTCATGTT	CGGGGAGGAT	CACCTGTGCT	TCCAGTCTCT	GCAGCGCTTC	ACGGCCGCCA
2161	CGCTGGAGCA	CGGCATGCAC	CCGCCGGTGT	CTCCCAAGCC	CGAGTGGCGC	AAGCTCATGG
2221	AGGAGATGGC	AGTCGTGGCC	ACGGAGGAGT	ACCGCTCCGT	CGTCGTCAAG	GAGCCGAGAT
2281	TCGTGAGATA	CITCAGATCG	GCTACCCCTG	AGACTGAGTA	CGGGAAGATG	AACATCGGCA
2341	GCCGGCCAGC	CAAGAGGAAG	CCGGGCGGGC	GCATCACCAC	CCTGCGCGCC	ATCCCTTGGA
2401	TCITTCGCTG	GACCCAGACG	AGGTTCACCC	TCCCCGTGTG	GCTGGGAGTC	GGCGCCGCC
2461	TCAAGTGGGC	CATCGACAAG	GACATCAAGA	ACTTCCAGAA	GCTCAAAGAG	ATGTACAACG
2521	AGTGGCCATT	CITCAGGGTC	ACCCTGGACC	TGCTGGAGAT	GGTTTTCGCC	AAGGGAGATC
2581	CTGGCATTGC	CGGCTTGTAT	GACTTGTGTC	TTGTGCGCGA	CGATCTCAAG	CCCTTTGGGA
2641	AGCAGCTCAG	GGACAAATAC	GTGGAGACAG	AGAAGCTTCT	CCTACAGATC	GCTGGGCACA
2701	AGGATATTCT	TGAAGGCGAT	CCTTACCTGA	AGCAGGGGCT	GCGGTATCGC	AATCCCTACA
2761	TCACCACCC	GAACGTGTTG	CAGGCCTACA	CGCTGAAGCG	GATAAGGGAT	CCGAGCTTCA
2821	AGGTGACGCC	GCAGCCGGCG	CTGTCCAAGG	AGTTCCGCCA	CGAGAACAAG	CCGCGCGGAC
2881	TGGTGAAGCT	GAACCCGGCG	AGCGAGTACC	CGCCCGGGCT	GGAAGACACG	CTCATCCTCA
2941	CCATGAAAGG	TATCGCCGCC	GGCATGCAGA	ACACCGGCTA	GGCCGCTTCC	CTTCACTCAC
3001	CTGCAGAGTA	CTGCACGGCA	ATAATAATCA	GCTTCCGGAT	GGTGTGTTTT	TGTCAGTTTT
3061	GGATGGAAAT	GCTGAAAAC	GACACCTTCT	GTTTTACTA	TGTTTATGTT	TATGTAATTT
3121	CTTCGGCTTT	GGCCTCTTTA	TATTTTCACT	CTTGTGTGTA	AGTCCAAGTG	GAAAAATCTT
3181	GGCATCTTAA	ACATATTGTA	ATAATGAACA	TCATACAATC	TACAAATTTA	CTATTTTGTG
3241	TTAATCTATC	TGGCAGGGAA	AATGTCACCT	TATATCCCAG	CCCATTGGAT	GGACTTTTTT
3301	ACCATGATGC	TAGTTCAACC	ATCCTCTTTT	GATTGTGCTA	AACAATTTCT	GAAATCAAA
3361	GCCTGGCAAT	ATATGTTACC	GTTTGAATC			

Fig. 2

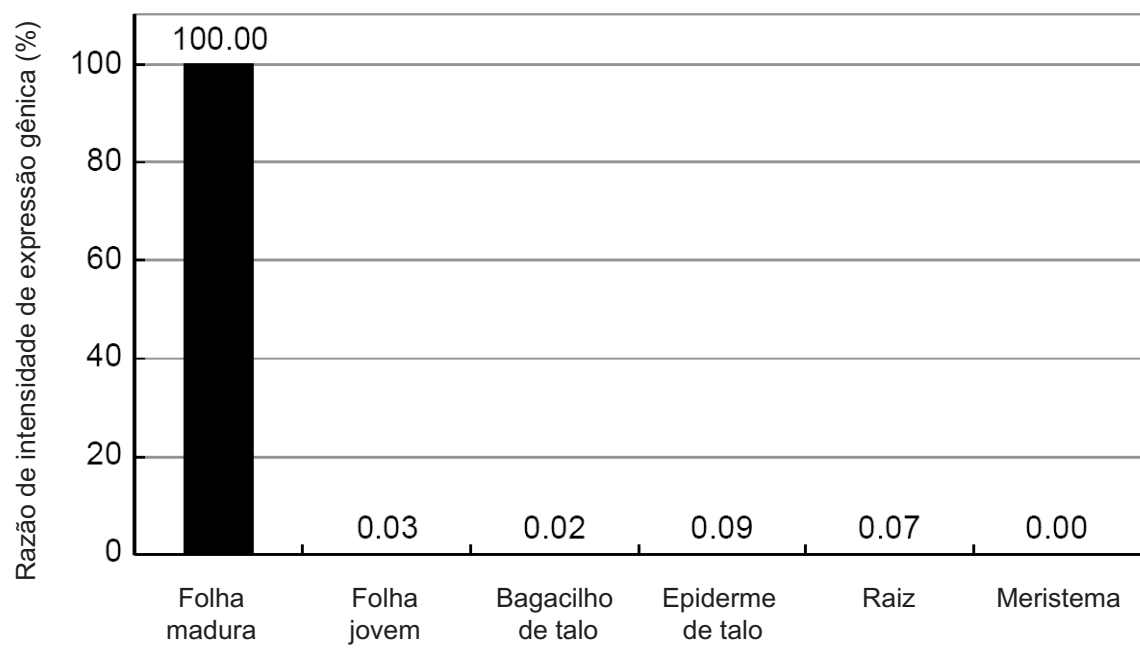


Fig. 3

HindIII

```

1  AAGCTT TAGG AGATGCGGTG TGGTACTAAA TGCAAGGTCC AAATTCAATG CTTTTTCCAT
61 GTTTCTTTGA AACGCAATGC CACATCTTTC TTTAAAGTAA GAACTGAGGG GTCCCATGTT
121 TCTTTTTGCA CTTTTCACAA GAATGTACAA CTGAAAATAT CATGAAACAT CATTACCCTC
181 TTTATATGCG TCGTCATCTA TTCACCTAAA CTCACTGATA GGATTGATGC ACTTCAGTAC
241 ACTCATACGT GACAACTACT GTTTTTGAAA GTGAACATTT GTAGTGCTAC TATTTGCATG
301 TATGGGAAAT TGGGAATTCT TTCTTGCCAT GGCTGATCCA GATCTCGACC TGCTTGATCT
361 AATGCAAACA TGCATGTTGA TAGCAAGCTG AGGATCTAGA GATATAAGGT GTTAGGAGAT
421 GCGGTGTGGT ACTAAATGCA AGGTCAAAAT TCCATGCTTT TTCCATGCTC AATTACCTAG
481 CATTCCTAA TTTTAAATTG TGATAACTAA TGCATCGAGC CATATATAAT TCAGTAAATA
541 TGTATATTTA AGCATATATA TATATATACA GTTTACATTT CTAATTCTTC TTTTTTTGTG
601 TGGAGGTCCG CGACGATGCA AGTTGCTCCC AACCCAAATT AATCCACCTC TCTTAAATCC
661 GCAGATCTTC ACCACCAGCA GCTACACATC GTATTGTGTC GGCTTGACCG CATGTGCGCG
721 CTGGGTTTTG GCAGCGCCTG AATGCAGTAC AGCCACCTGT ATGGTGCCCT TGGTAGAGTA
781 ACACCCTTAT CCCTACGGCA GCCATGTATA ACCCTTATCC CTACGGCAGC CATGTATTGT
841 AGCCCATCTT CTTAACCACA AGTTCATTTT AAATTTCCGG CCGGTCTCTT GAGGAAATCA
901 AATTTTATTT TCACAATTTA TATGGATATA GGATAATCTA TGTTCCTAAC AGTGGCTAAC
961 AGGCTCCCTC TCCTCCACAT ACATCGCGTG CAAGCATTCC TCCAAACTCT TCCGATCCCC
1021 CGAATCCAGC CTTGACTGCA AACAGACGCC CCTCTCCACA TCCTGCACAC CCATCAGCCA
1081 ACGGAATAAC AGAAGAAGGC GAGTGAGCAG TGACAAAAGCA CGTCAACAGC AGCGAGCCAA
1141 GCCAAAATGG AGCCAGGAGC AAGCCGCGGC CGCAGCTCTC CCGGTCCCCC TTGCGGTTAC
1201 CGCTAGCAAA CGCCCCTCTC CACATCCTGC AACACAAGGA GGCAAGTGCG CAGTGACAAA
1261 GTACGTCCAC AGCAGCGAGC CAAGCCAAAA GGAGCTCAGC CACAGCCGCA GCTCTCGGCT
1321 ACCGTTACCG CCGATCACAT GCATGCCTTT CCAAACGCCA AGGGCCGCGC AATCCCGTGC
1381 ACACCGACCA CACACTCGCC AACTCCCCAT CCCTATTTGA AGCCACCGGC CCGCGCACTG
1441 CATTGATCAA CTCGCAGCAG TAGAGCAGCA CGAGCAACAC GCCGCGCCGC TCCAACCATC
1501 TCAGCTTCGC GCTTCCCGCG CCGCGCCGCC GCGCCCGCCA TG CCTAGG

```

Códon de iniciação Bln I

Fig. 4

(A)

```

1  tgcaccacac acagttcagc tagcagatca cctagctaga tagctgcctc tatcacagta
61  tatttgctcc ctgcaacttg ctgctgctgc aatagctagc agctgcagct agtaagcaaa
121 actataaacc ttcagggttt ttgcaagat cgatggccgg aagtggcagg gacagggacc
181 ctcttggtgt tggtagggtt gtgggtgatg tgctggacgc gttcgtccgg agcaccaacc
241 tcaagggtcac ctatggctcc aagaccgtgt ccaatggctg cgagctcaag ccgtccatgg
301 tcaccacacca gcctagggtc gaggtcggcg gcaatgacat gaggacattc tacacccttg
361 tgatggtaga cccagatgca ccaagcccaa gtgaccctaa ccttagggag tatctacatt
421 ggttggtcac tgatattcct ggtactactg cagcgtcatt tgggcaagag gtgatgtgct
481 acgagagccc aaggccaacc atggggatcc accggctggt gttcgtgctg ttccagcagc
541 tggggcgctc gacagtgtac gcgcccggtt ggcgtcagaa cttcaacacc aaggacttcg
601 ccgagctcta caacctcggc tcgccggtcg ccgccgtcta cttcaactgc cagcgcgagg
661 caggctccgg cggcaggagg gtctaccctt agctaacgat gatcccgatc gatctgctgc
721 atgctcacta tcatcatcca gcatgctata cattgcaggt tcagacaatt gaaatgattc
781 tcgacacaca acatatatat gatggtgtaa ttaattatgc aattaaatag ctgagcaagg
841 ctaaggt

```

(B)

```

1  Met Ala Gly Ser Gly Arg Asp Arg Asp Pro Leu Val Val Gly Arg Val
17  Val Gly Asp Val Leu Asp Ala Phe Val Arg Ser Thr Asn Leu Lys Val
33  Thr Tyr Gly Ser Lys Thr Val Ser Asn Gly Cys Glu Leu Lys Pro Ser
49  Met Val Thr His Gln Pro Arg Val Glu Val Gly Gly Asn Asp Met Arg
65  Thr Phe Tyr Thr Leu Val Met Val Asp Pro Asp Ala Pro Ser Pro Ser
81  Asp Pro Asn Leu Arg Glu Tyr Leu His Trp Leu Val Thr Asp Ile Pro
97  Gly Thr Thr Ala Ala Ser Phe Gly Gln Glu Val Met Cys Tyr Glu Ser
113 Pro Arg Pro Thr Met Gly Ile His Arg Leu Val Phe Val Leu Phe Gln
129 Gln Leu Gly Arg Gln Thr Val Tyr Ala Pro Gly Trp Arg Gln Asn Phe
145 Asn Thr Lys Asp Phe Ala Glu Leu Tyr Asn Leu Gly Ser Pro Val Ala
161 Ala Val Tyr Phe Asn Cys Gln Arg Glu Ala Gly Ser Gly Gly Arg Arg
177 Val Tyr Pro

```



Fig. 5

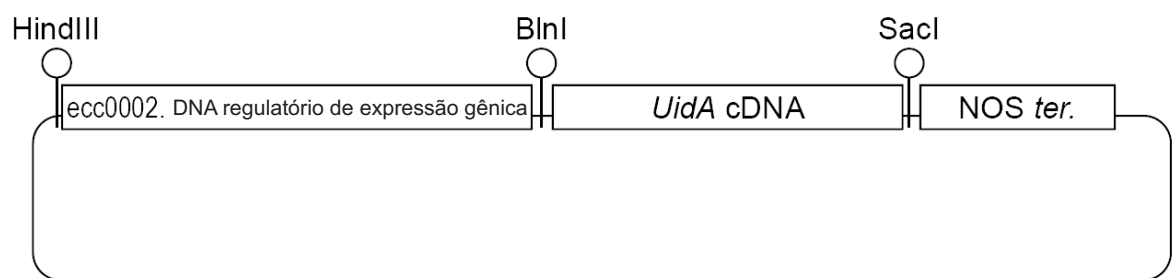


Fig. 6

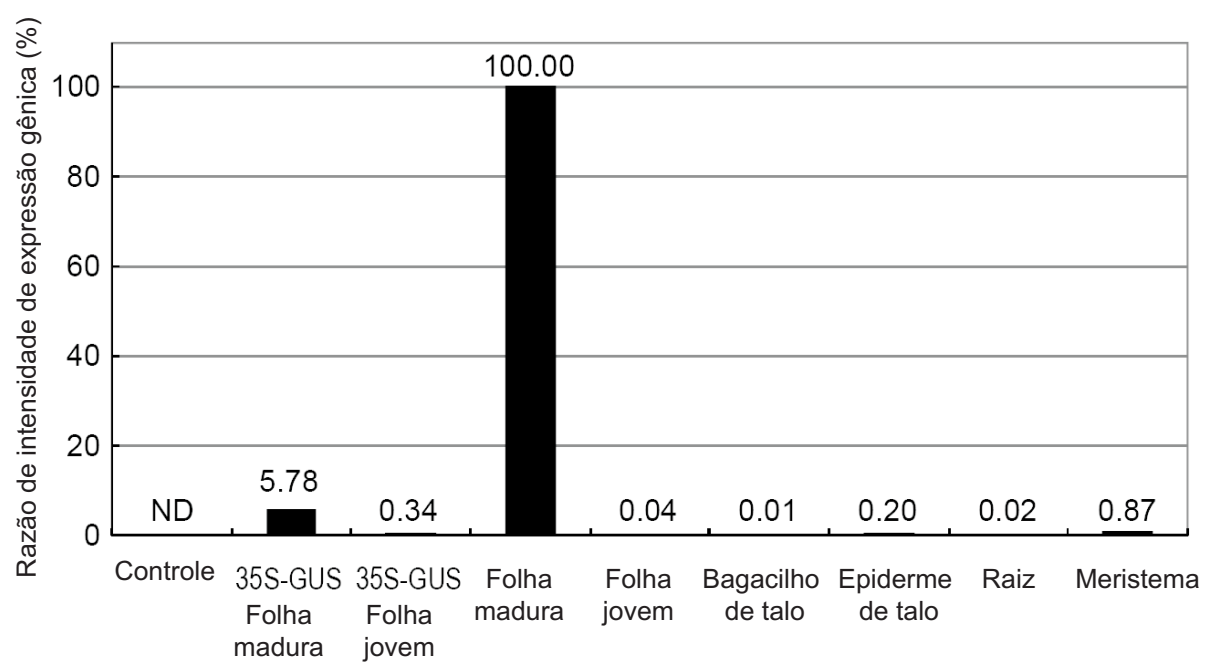


Fig. 7

```

1  AAGCTTTAGG AGATGCGGTG TGGTACTAAA TGCAAGGTCC AAATTCAATG CTTTTTCCAT
61  GTTTCTTTGA AACGCAATGC CACATCTTTC TTAAAGTAA GAACTGAGGG GTCCCATGTT
121 TCTTTTTGCA CTTTTCACAA GAATGTACAA CTGAAAATAT CATGAAACAT CATTACCCTC
181 TTTATATGCG TCGTCATCTA TTCACCTAAA CTCACTGATA GGATTGATGC ACTTCAGTAC
241 ACTCATACGT GACAACTACT GTTTTTGAAA GTGAACATTT GTAGTGCTAC TATTTGCATG
301 TATGGGAAAT TGGGAATTCT TTCTTGCCAT GGCTGATCCA GATCTCGACC TGCTTGATCT
361 AATGCAACA TGCATGTTGA TAGCAAGCTG AGGATCTAGA GATATAAGGT GTTAGGAGAT
421 GCGGTGTGGT ACTAAATGCA AGGTCAAAAT TCCATGCTTT TTCCATGCTC AATTACCTAG
481 CATTTCTTAA TTTTAAATTG TGATAACTAA TGCATCGAGC CATATATAAT TCAGTAAATA
541 TGTATATTTA AGCATATATA TATATATACA GTTTACATTT CTAATTCTTC TTTTTTGTG
601 TGGAGGTCCG CGACGATGCA AGTTGCTCCC AACCCAAATT AATCCACCTC TCTTAAATCC
661 GCAGATCTTC ACCACCAGCA GCTACACATC GTATTGTGTC GGCTTGACCG CATGTGCGCG
721 CTGGGTTTTG GCAGCGCCTG AATGCAGTAC AGCCACCTGT ATGGTGCCCT TGGTAGAGTA
781 ACACCCTTAT CCCTACGGCA GCCATGTATA ACCCTTATCC CTACGGCAGC CATGTATTGT
841 AGCCCATCTT CTTAACCACA AGTTCATTTT AAATTTCCGG CCGGTCTCTT GAGGAAATCA
901 AATTTTATTT TCACAATTTA TATGGATATA GGATAATCTA TGTTCTAAC AGTGGCTAAC
961 AGGCTCCCTC TCCTCCACAT ACATCGCGTG CAAGCATTCC TCCAAACTCT TCCGATCCCC
1021 CGAATCCAGC CTTGACTGCA AACAGACGCC CCTCTCCACA TCCTGCACAC CCATCAGCCA
1081 ACGGAATAAC AGAAGAAGGC GAGTGAGCAG TGACAAAGCA CGTCAACAGC AGCGAGCCAA
1141 GCCAAAATGG AGCCAGGAGC AAGCCGCGGC CGCAGCTCTC CCGGTCCCCC TTGCGGTTAC
1201 CGCTAGCAAA CGCCCCTCTC CACATCCTGC AACACAAGGA GGCAAGTGCG CAGTGACAAA
1261 GTACGTCCAC AGCAGCGAGC CAAGCCAAAA GGAGCTCAGC CACAGCCGCA GCTCTCGGCT
1321 ACCGTTACCG CCGATCACAT GCATGCCTTT CCAAACGCCA AGGGCCGCGC AATCCCGTGC
1381 ACACCGACCA CAACTCGCC AACTCCCAT CCCTATTTGA AGCCACCGGC CCGCGCACTG
1441 CATTGATCAA CTCGCAGCAG TAGAGCAGCA CGAGCAACAC GCCGCGCCGC TCCAACCATC
1501 TCAGCTTCGC GCTTCCGCG CCCC GCCGCC GCGCCGCCa tggccggaag tggcagggac
1561 agggaccctc ttgtggttg tagggttggt ggtgatgtgc tggacgcgtt cgtccggagc
1621 accaacctca aggtcaccta tggctccaag accgtgtcca atggctgcga gctcaagccg
1681 tccatggtca cccaccagcc tagggtcgag gtcggcggca atgacatgag gacattctac
1741 acccttgtga tggtagacc agatgcacca agcccaagt accctaacct tagggagtat
1801 ctacattggt tggctactga tattcctggt actactgcag cgtcatttgg gcaagaggtg
1861 atgtgctacg agagcccaag gccaaccatg gggatccacc ggctggtgtt cgtgctgttc
1921 cagcagctgg ggcgtcagac agtgtacgcg cccgggtggc gtcagaactt caacaccaag
1981 gacttcgccg agctctacaa cctcggctcg ccggtcgccg ccgtctactt caactgccag
2041 cgcgaggcag gctccggcgg caggagggtc taccocctag

```

Fig. 8



Fig. 9

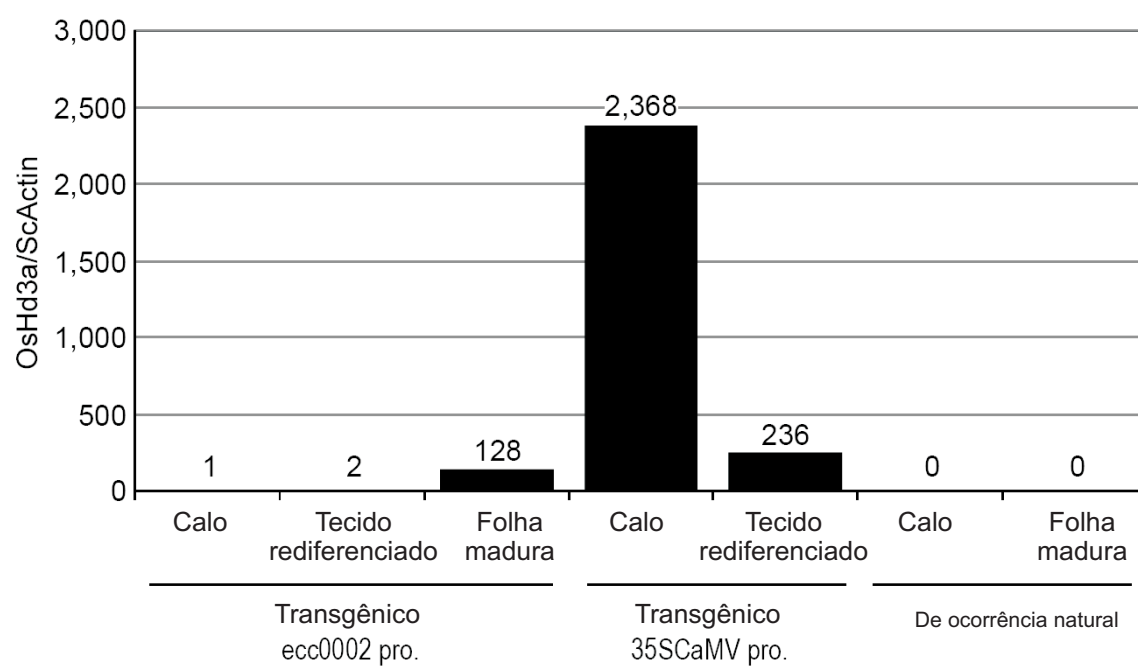


Fig. 10

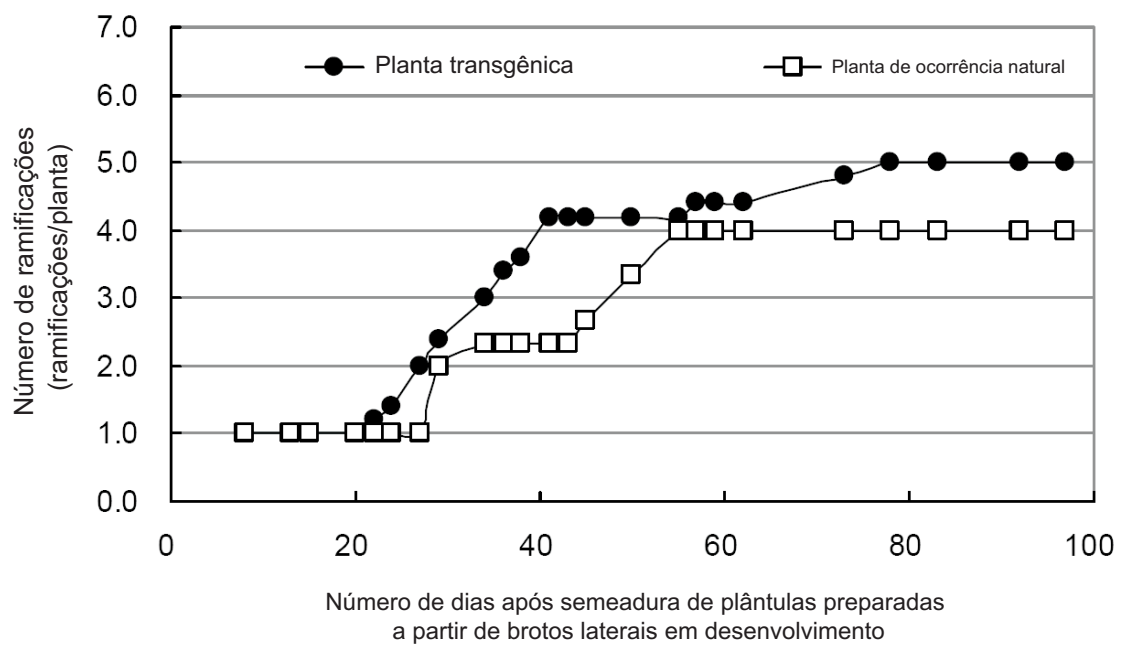


Fig. 11

