



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

(21) **PI0616222-3 A2**

(22) Data de Depósito: 20/03/2006
(43) Data da Publicação: 14/06/2011
(RPI 2110)



* B R P I 0 6 1 6 2 2 2 A 2 *

(51) Int.Cl.:

C12N 15/09 2006.01
A01H 1/00 2006.01
A01H 5/00 2006.01
C12N 1/15 2006.01
C12N 1/19 2006.01
C12N 1/21 2006.01
C12N 5/10 2006.01

(54) Título: **GENE, PROTEÍNA RECOMBINANTE, VETOR RECOMBINANTE, MÉTODOS PARA PREPARAR UMA PLANTA TRANSGÊNICA E PARA APERFEIÇOAR A TOLERÂNCIA A ESTRESSE DE UMA PLANTA**

(30) Prioridade Unionista: 16/09/2005 JP 2005-270970

(73) Titular(es): INCORPORATED ADMINISTRATIVE AGENCY
JAPAN INTERNATIONAL RESEARCH CENTER FOR
AGRICULTURAL SCIENCES

(72) Inventor(es): FENG QIN, KAZUKO SHINOZAKI,
KYONOSHIN MARUYAMA, MASAYUKI KAKIMOTO, YOH SAKUMA

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

(86) Pedido Internacional: PCT JP2006306057 de 20/03/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/032111de
22/03/2007

(57) Resumo: GENE, PROTEÍNA RECOMBINANTE, VETOR RECOMBINANTE, MÉTODOS PARA PREPARAR UMA PLANTA TRANSGÊNICA E PARA APERFEIÇOAR A TOLERÂNCIA A ESTRESSE DE UMA PLANTA. A presente invenção refere-se a um fator de transcrição indutível por estresse, derivado de milho, a um gene que codifica o mesmo e a um método para usar o mesmo. Especificamente, a presente invenção põe à disposição um gene, que compreende o seguinte DNA (a) ou (b): (a) DNA que consiste na sequência de nucleotídeo, tal como mostrada na SEQ ID NO: 1; ou (b) DNA derivado de milho que se hibridiza sob condições constitivas com DNA, constituído de uma sequência de nucleotídeo que é complementar ao DNA constituído da sequência de nucleotídeo, tal como mostrada na SEQ ID NO: 1 e codifica uma proteína, que regula a transcrição de um gene localizado a jusante de um elemento sensível a estresse. Além disso, a presente invenção refere-se a uma planta transgênica com tolerância aperfeiçoada a estresses ambientais, tais como estresse por alta temperatura ou desidratação, na qual esse gene foi introduzido.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**GENE, PROTEÍNA RECOMBINANTE, VETOR RECOMBINANTE, MÉTODOS PARA PREPARAR UMA PLANTA TRANSGÊNICA E PARA APERFEIÇOAR A TOLERÂNCIA A ESTRESSE DE UMA PLANTA**".

5 campo da TÉCNICA

A presente invenção refere-se a um fator de transcrição indutível por estresse, derivado do milho, um gene que codifica o mesmo e um método para usar o mesmo.

ANTECEDENTE DA TÉCNICA

10 As plantas possuem mecanismos de tolerância para enfrentar diversos tipos de estresses ambientais na natureza, tais como desidratação, alta temperatura, congelação ou estresse por sal. Considera-se que os genes que reagem a esses diversos tipos de estresses ambientais se sobreponham, e considera-se que a tolerância a cada estresse seja atingida como resultado
15 de respostas intracelulares intimamente relacionadas (Plant Physiol., 115: 327-334, 1997). Porém, genes que reagem a cada estresse são diferentes entre estresses por temperatura, desidratação e sal e sugere-se que esses genes tenham sistemas para reconhecer separadamente cada estresse.

No passado, os presentes inventores isolaram e identificaram
20 fatores de transcrição que se ligam a um elemento cis, sensível a estresses, especificamente ativam a transcrição de genes localizados a jusante dos mesmos, e conferem tolerância a estresses às plantas. Exemplos incluem os genes DREB, tais como os genes DREB1A, DREB1B, DREB1C, DREB2A e DREB2B, de *Arabidopsis thaliana* (Publicação de Patente Japonesa (kokai)
25 No. 10-228457 A (1998)). Eles informaram que a introdução e superexpressão dos genes em uma planta possibilitaram que a tolerância a estresses seja conferida sem o retardamento de uma planta (Publicação de Patente Japonesa (kokai) No. 10-292348 A (1998)).

As proteínas de DREB são classificadas grosseiramente no tipo
30 DREB1 e no tipo DREB2, e os dois têm domínios de ligação de DNA (domínios AP2/ERF) que reconhecem e se ligam à sequência de DRE. Ortólogos de DREB1 dos genes DREB em diversas plantas, tais como arroz e milho,

foram estudados (The Plant Cell Physiology, 45: 1042-1052, 2004); porém os tipos DREB2 praticamente não foram estudados e exemplos de ortólogos de DREB2 estão limitados a perivca de Madagascar ORCA1, arroz Os-DREB2A e similares.

5 Os genes DREB1 têm uma sequência de D/SEV/LR conservada no domínio de AP2/ERF, e os genes DREB2 têm a sequência de AEIR. Considera-se que essa diferença diferencie suas propriedades de ligação ao DNA (The Plant Cell, 10:1-17, 1998).

10 Plantas que superexpressam DREB1A, que é do tipo DREB1, apresentam uma tolerância aperfeiçoada a estresses por desidratação, sal e baixas temperaturas; mas, plantas que superexpressam DREB2A, que é do tipo DREB2, ou um ortólogo de arroz do mesmo, OsDREB2A, não expressam um fenótipo claro ou tolerância a estresses aperfeiçoada (The Plant Cell, 10:1-17, 1998). Isto é, a ativação dos tipos DREB2, que era conhecida, necessitou
15 de alguma modificação, tal como remoção de uma região específica.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção destina-se a identificar um gene derivado de milho, do tipo DREB2, e pôr à disposição uma nova planta tolerante a estresses ambientais, através da análise da função desse gene identificado.

20 A presente invenção conseguiu identificar um gene DREB2A congênito do milho e designou o mesmo como "ZmDREB2A". Diferentemente de DREB2A, ZmDREB2A apresenta a atividade de um fator de transcrição sem modificação e aperfeiçoa a tolerância a estresses ambientais de plantas. Além disso, verificou-se que ZmDREB2A aperfeiçoa a tolerância a altas
25 temperaturas.

Especificamente, a presente invenção refere-se a um gene que codifica ZmDREB2A, que é um fator de transcrição derivado de um milho. Mais especificamente, esse gene compreende os seguintes DNA (a) ou (b):

30 (a) DNA que consiste na sequência de nucleotídeo, tal como mostrada em SEQ ID NO: 1; ou

(b) DNA derivado de milho, que se hibridiza sob condições rígidas com DNA constituído de uma sequência de nucleotídeo que é comple-

mentar ao DNA constituído da sequência de nucleotídeo, tal como mostrada em SEQ ID NO: 1 e codifica uma proteína que regula a transcrição de um gene localizado a jusante de um elemento sensível a estresse.

O gene da presente invenção codifica a seguinte proteína (c) ou (d):

5 (c) uma proteína que consiste na sequência de aminoácido, tal como mostrada em SEQ ID NO: 2; ou

(d) uma proteína derivada de milho, que consiste em uma sequência de aminoácido derivada da sequência de aminoácido, tal como mostrada na SEQ ID NO: 2 por remoção, substituição ou adição de um ou mais aminoácidos e regula a transcrição de um gene localizado a jusante de um elemento sensível a estresse.

O gene da presente invenção é capaz de regular a tolerância de uma planta a estresses ambientais, tais como estresse por desidratação, alta temperatura ou sal.

15 A presente invenção também põe à disposição a proteína recombinante (c) ou (d) acima.

Essa proteína recombinante pode ser obtida introduzindo o gene da presente invenção em uma célula hospedeira adequada, deixando que o gene se expresse na mesma e recuperar o produto resultante de uma solução de cultura ou similar.

A presente invenção também põe à disposição um vetor recombinante, que compreende o gene da presente invenção e uma célula hospedeira ou planta transgênica, que foi transformado com esse vetor.

25 A planta transgênica na qual o gene da presente invenção foi introduzido e expressado a um nível alto apresenta tolerância aperfeiçoada a estresses ambientais, tais como estresses por desidratação, alta temperatura ou sal. A presente invenção também põe à disposição um método para aperfeiçoar a tolerância a estresses de uma planta através da introdução do gene da presente invenção nessa planta.

30 O gene ZmDREB2A da presente invenção apresenta atividade de um fator de transcrição, sem modificação, e pode aperfeiçoar a tolerância a estresses ambientais de plantas, diferentemente do DREB2A conhecido ou

um ortólogo do mesmo (por exemplo, OsDREB2A). Além disso, o gene ZmDREB2A também pode aperfeiçoar a tolerância à alta temperatura de plantas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1A mostra uma sequência de nucleotídeo de comprimento total do cDNA de forma longa de ZmDREB2A. A figura 1A mostra uma sequência de cDNA de comprimento total do ZmDREB2A, que compreende uma parte que é considerada como sendo um íntron. Uma parte sublinhada indica um íntron.

A figura 1B mostra uma sequência de nucleotídeo e uma sequência de aminoácidos putativa do cDNA de forma curta de ZmDREB2A. O domínio de AP2 está sublinhado e indicado por caracteres alfanuméricos, e o sinal de transporte nuclear está sublinhado com linha dupla. Muitos aminoácidos ácidos estão presentes no terminal C e, desse modo, o terminal C é considerado como sendo um domínio de ativação transcricional.

A figura 2(A) mostra os resultados da análise Northern do gene ZmDREB2A em milho. A figura 2(B) mostra os resultados da amplificação simultânea do cDNA de forma curta e do cDNA de forma longa por RT-PCR. Dois grupos são observados no momento da aplicação de cada forma de estresse (estresse por baixa temperatura por 24 horas, estresse por alta temperatura por 10 minutos, estresse por desidratação por 1 hora, e estresse por NaCl por 24 horas; D: o controle positivo da forma longa; B: o controle positivo da forma curta; N: o controle negativo).

A figura 3 mostra os resultados da análise de expressão do mRNA de forma longa e mRNA de forma curta por RT-PCR (♦: mRNA de forma longa; ■ mRNA de forma curta; forma longa não tratada: 1) figura 3(A) mostra os resultados da análise de expressão do mRNA de forma longa e do mRNA de forma curta por RT-PCR; figura (3B) mostra a quantidade alterada de mRNA de forma longa e que de mRNA de forma curta, representados por um gráfico que indica a mudança da quantidade sem aplicação de estresse.

A figura 4 mostra os resultados da análise Southern do gene ZMDREB2A no milho: à esquerda: condições de baixa constrição (0,5% de SSC, 0,5% de SDS, 50°C); à direita: condições de alta constrição (0,1% de

SSC, 0,1% de SDS, 65°C).

A figura 5A mostra os resultados da análise de atividade de ZmDREB2A (atividade da proteína de 2 modalidades de ZmDREB2A), usando o protoplasto T87. O valor experimental é determinado dividindo a atividade de GUS pela atividade de LUC, e o valor obtido com o uso de um vetor apenas é mostrado com 1 como um controle: DREB2A FL: DREB2A de comprimento local; DREB2A CA; DREB2A modificado.

A figura 5B mostra os resultados da análise de domínio ativo de ZmDREB2A (uma variante de ZmDREB2A removida internamente), usando o protoplasto T87. O valor experimental é determinado dividindo a atividade de GUS pela atividade de LUC, e o valor obtido com o uso de um vetor vazio é mostrado com 1 como um controle.

A figura 6 mostra os resultados da pesquisa de homologia de uma sequência de aminoácido parcial de ZmDREB2A. Milheto perliífero (*Pennisetum glaucum*: PgDREB2A), cevada (*Hordeum vulgare*: HvDRF1), arroz (*Oryza sativa*: OsDREB2B). Impressões em vermelho indicam partes homólogas = *: aminoácido conservado por 4 sequências; .: aminoácido conservado por 3 sequências.

A figura 7 mostra os níveis de expressão de ZmDREB2A e rd29A em *Arabidopsis thaliana*, que superexpressa ZmDREB2A.

A figura 8 mostra as características de *Arabidopsis thaliana*, que superexpressa ZmDREB2A. (A) O fenótipo de *Arabidopsis thaliana*, que superexpressa ZmDREB2A: foi observada a morfologia sob condições de crescimento comuns. A parte superior mostra uma planta que foi cultivada por 21 dias em meio de ágar; e a parte inferior mostra uma planta 35 dias após a semeadura. Essa planta foi cultivada por 2 semanas em um meio de ágar e depois transplantada no solo (isto é, 15 dias depois de transplantada). Uma variedade introduzida de vetor vazio foi usada como uma variedade do tipo silvestre. (B) A expressão de ZmDREB2A e de genes induzidos sob cada estresse, uma estresse de baixa temperatura foi aplicada colocando a planta a 5°C, a estresse de desidratação foi induzida colocando a planta extraída do meio em uma placa de petri e tratando a planta na mesma, à tem-

peratura ambiente. A estresse de sal foi induzida colocando a planta em 250 mM de NaCl por 5 horas.

5 A figura 9 mostra os resultados de um teste de tolerância a estresses de *Arabidopsis thaliana*, que superexpressa ZmDREB2A. (A) Tolerância à congelação: parte superior: o controle; parte inferior: após o tratamento por congelação; (B) tolerância à desidratação: valores numéricos entre parênteses indicam as relações de contagens viáveis/número de amostras.

A figura 10 mostra a tolerância à estresse por alta temperatura de *Arabidopsis thaliana*, que superexpressa ZmDREB2A, usando o promotor 35S.

10 A figura 11 mostra plantas às quais foi aplicada uma carta por alta temperatura e a relação de sobrevivência das mesmas (desvio médio e padrão ($N \geq 50$)). No desenho, WT indica uma planta de controle, na qual ZmDREB2A não foi introduzido. A, B e C indicam, cada um deles, uma planta na qual foi introduzido ZmDREB2A (3 linhas).

15 A figura 12 mostra os resultados da análise Northern de plantas que foram cultivadas sob condições de crescimento comuns, sob condições de estresse por alta temperatura, sob condições de estresse por sal e sob condições de estresse por desidratação. No desenho, WT indica uma planta de controle, na qual ZmDREB2A não foi introduzido; 35S: ZmDREB2A-a, 35S: ZmDREB2A-b, e 35S: ZmDREB2A-c, cada um dos quais indica uma planta na qual ZmDREB2A foi introduzido (3 linhas).

20 A figura 13 mostra a tolerância a estresse de *Arabidopsis thaliana*, que superexpressa ZmDREB2A, usando o promotor rd29A indutível por estresse. No sendo, rd29A: ZmDREB2A-a, rd29A: ZmDREB2A-b, e rd29A: ZmDREB2A-c, cada um dos quais indica uma planta na qual ZmDREB2A foi introduzido (3 linhas).

A figura 14 mostra a tolerância à estresse por alta temperatura da *Arabidopsis thaliana*, que superexpressa DREB2A ativo (DREB2A modificado), usando o promotor 35S.

30 Esta especificação inclui parte ou todo o teor, tal como descrito na especificação do Pedido de Patente Japonês No. 2005-270970, que é um documento de prioridade do presente pedido.

MELHORES MODOS PARA EXECUTAR A INVENÇÃO

O gene da presente invenção é um gene derivado de milho, que codifica um fator de transcrição, que se liga a um elemento cis localizado a montante dos genes que codificam proteínas reativas a estresses, expressadas em resposta a estresses ambientais, tais como estresses por temperatura, desidratação ou sal, desse modo ativando a transcrição. Exemplos específicos do elemento cis acima incluem elemento sensível a desidratação (DRE), elemento sensível a ácido abscísico (ABRE), e elemento sensível a baixa temperatura. A proteína codificada pelo gene da presente invenção funciona para ativar a transcrição de genes localizados a jusante dos elementos sensíveis a estresse mencionados acima (DRE e similares).

O gene de acordo com a presente invenção pode ser identificado, por exemplo, tal como descrito abaixo.

1. Identificação do gene da presente invenção

O gene de acordo com a presente invenção pode ser detectado com base na homologia com um gene conhecido com funções análogas; isto é, um gene que codifica um fator de transcrição específico para um gene tolerante a estresse de uma planta. Coleções de mRNA e cDNA de milho ou uma biblioteca de genomas de milho pode ser preparada e pode ser submetida a uma detecção. Alternativamente, um banco de dados existente de DNA de milho pode ser submetido a uma detecção.

Os genes detectados são submetidos a uma clonagem adequada e todas as sequências de nucleotídeos dos mesmos são determinadas de acordo com métodos convencionais. A sequenciação de nucleotídeos inclui o método de modificação química de Maxam-Gilbert ou o método de terminação de cadeia de dideoxynucleotídeo, usando um fato M13. Normalmente, a sequenciação é realizada usando um sequenciador de nucleotídeo automático (por exemplo, 377 DNA Sequencer Perkin-Elmer).

Desse modo, 2 tipos de cDNAs (ZmDREB2A forma curta: SEQ ID NO: 1; ZmDREB2A forma longa: SEQ ID NO: 3) foram isolados como ortólogos de DREB2A derivados de milho. Analisando os ORFs dos mesmos, foram identificadas proteínas codificadas pelos genes de interesse, as prote-

ínas ZmDREB2A (forma curta: SEQ ID NO:2; forma longa: SEQ ID NO: 4). Um cDNA mais longo (isto é, a forma longa) dos 2 tipos identificados de cDNAs compreendia um íntron de 53 bp, e o outro sDNA (isto é, a forma curta) não compreendia o mesmo. Devido à presença do íntron, ocorreu uma mudança de estrutura e deduziu-se que a sequência de aminoácido codificada era muito curta. Em contraste, deduziu-se que a sequência de aminoácido codificada pela forma curta era de um tipo de DREB2.

A figura 1A mostra a sequência de nucleotídeo do cDNA de forma longa e a figura 1B mostra a sequência de nucleotídeo e a sequência de aminoácido putativa do cDNA de forma curta. Tal como descrito abaixo, o cDNA de forma curta funciona como uma forma ativa do gene ZmDREB2A, e esse gene ativo ZmDREB2A (SEQ ID NO: 1) é referido como o gene da presente invenção.

O gene de acordo com a presente invenção não está limitado ao gene que compreende a sequência de nucleotídeo, tal como mostrada em SEQ ID NO: 1. Um DNA que compreende um gene, que é hibridizável sob condições constitivas com DNA que compreende uma sequência de nucleotídeo que é complementar ao DNA que compreende uma sequência de nucleotídeo, tal como mostrada em SEQ ID NO:1, é também o gene da presente invenção, desde que ele codifique proteínas que regulam a transcrição de genes localizados a jusante de um elemento sensível a estresse. Sob "condições constitivas", a hibridização é realizada com uma concentração de formamida de 30%-50%, a 37°C a 50°C, em uma solução de 6 x SSC. De preferência, a hibridização é realizada com uma concentração da formamida de 50%, a 42°C, em uma solução de 6 x SSC.

Os genes da presente invenção codificam proteínas, que compreendem sequências de aminoácido, tais como mostradas em SEQ ID NO: 2. Ainda que a proteína compreenda uma sequência de aminoácido derivada da sequência de aminoácido, tal como mostrada em SEQ ID NO:2 por remoção, substituição ou adição de um ou mais aminoácidos, os genes que codificam essas proteínas estão dentro do âmbito dos genes da presente invenção, desde que essa proteína possa regular a transcrição dos genes locali-

zados a jusante de um elemento sensível a estresse. O termo "mais amino-ácidos" refere-se, de preferência, a 20 ou menos e, de modo particularmente preferido, a 5 ou menos aminoácidos.

5 A introdução de mutação no gene da presente invenção pode ser realizada por técnicas convencionais, tais como o método de Kunkel, o método duplex interrompido ("gapped duplex") ou variações do mesmo, usando um kit de introdução de mutação (por exemplo, Mutant-K (Takara) ou Mutant-G (Takara)), utilizando, por exemplo, mutagênese dirigida à posição ou usando um LA PCR in vitro Mutagenesis Series Kit (Takara).

10 Uma vez que a sequência de nucleotídeo para o gene da presente invenção tenha sido determinada, o gene da presente invenção pode ser obtido, quer por síntese química, por PCR usando o cDBA ou DBA genômico do gene como um gabarito, quer pela hibridização do fragmento de DNA com a sequência de nucleotídeo acima como um sonda.

15 2. Análise da capacidade de ligação ao DRE e capacidade de ativar a transcrição das proteínas da presente invenção

(1) Análise da capacidade de ligação ao DRE

A capacidade da proteína de acordo com a presente invenção de ligar-se ao DRE pode ser confirmada pelo teste de mudança no gel (U-
20 rao, T. et al., Plant Cell 5:1529-1539, 1993), usando uma proteína de fusão composta da proteína, GST e similar. A proteína de acordo com a presente invenção pode ser preparada ligando o gene de acordo com a presente invenção a jusante da região de codificação da glutadiona S transferase de (GST) de um plasmídio que codifica o gene de GST (por exemplo, vetor
25 pGEX-4T-1: Pharmacia), de tal modo que as estruturas de leitura dos dois genes coincidam uma com a outra, cultivando *E. coli* que foi transformado com o plasmídio, sob condições que induzem a síntese da proteína de fusão, e purificando a proteína do *E. coli* transformado.

30 O teste de mudança no gel é um método para examinar a interação entre DNA e uma proteína. Um fragmento de DNA que contém DRE, marcado com ³²P ou similar, é misturado com a proteína de fusão descrita acima e incubado, e a mistura resultante é submetida a uma eletroforese.

Depois da secagem, o gel é autorradiografado para detectar os grupos que migraram para o lado posterior, como resultado da ligação do fragmento de DBA com a proteína. A ligação específica da proteína de acordo com a presente invenção à sequência de DRE pode ser confirmada mostrando que o grupo acima mencionado não é detectado quando é usado um fragmento de DNA que contém uma sequência de DRE mutante.

(2) Análise da capacidade de ativar a transcrição

A capacidade de ativar a transcrição das proteínas da presente invenção pode ser analisada por um teste de transativação usando um sistema de protoplasto de milho. Por exemplo, cDNA de ZmDREB2A é ligado ao plasmídeo pBI221 (Clontech), que contém um promotor de CaMV35S para construir um plasmídeo eficiente. Por outro lado, o fragmento de DNA que contém DRE é ligado a montante do promotor de TATA, localizado a montante de um gene de β -glucoronidase (GUS) para construir um plasmídeo transmissor. Subsequentemente, esses dois plasmídios são introduzidos em protoplastos de milho e, depois, a atividade de GUS é medida. Se a atividade de GUS for aumentada pela expressão simultânea da proteína de ZmDREB2A, deduz-se que a proteína de ZmDREB2A expressada nos protoplastos está ativando a transcrição através da sequência de DRE.

Na presente invenção, a preparação de protoplastos e introdução de DNA de plasmídeo nos protoplastos podem ser realizadas pelo método de Abel et al. (Abel, S. et al., Plant J. 5:421-427, 1994). A fim de minimizar erros experimentais resultantes de diferenças nas eficiências de introdução do DNA de plasmídeo, um plasmídeo, no qual um gene de luciferase está ligado a jusante do promotor de CaMV35S, pode ser introduzido nos protoplastos, junto com os dois plasmídios descritos acima, e a atividade de β -glucurodinase contra a atividade de luciferase pode ser determinada. Depois, o valor determinado pode ser usado para indicar a capacidade de ativar a transcrição. A atividade de β -glucurodinase pode ser determinada pelo método de Jefferson et al. (Jefferson, R.A. et al., EMBO J. 83:8447-8451, 1986); e a atividade da luciferase pode ser determinada usando o kit de teste Pica-Gene Luciferase (Tokyo Ink).

3. Preparação de vetores recombinantes e transformantes

(1) Preparação de vetores recombinantes

O vetor recombinante da presente invenção pode ser obtido ligando (inserindo) o gene da presente invenção em um vetor apropriado. O vetor no qual o gene da presente invenção deve ser inserido não está particularmente limitado, desde que seja replicável em um hospedeiro. Por exemplo, DNA de plasmídio, DNA de fago, ou similar podem ser usados. DNA de plasmídio inclui: plasmídios para hospedeiros de *E. coli*, tais como pBR322, pBR325, pUC118 e pUC119; plasmídios para hospedeiros de *Bacillus subtilis*, tais como pUB110 e pTP5; plasmídios para hospedeiros de levedo, tais como YEp13, YEp24 e YCp50; e plasmídios para hospedeiros de células de plantas, tais como pBI221 e pBI1121. DNA de fago inclui fago λ e similar. Além disso, um vetor de vírus animal, tal como um vetor de retrovírus ou de vírus de vaccinia ou um vetor de vírus de inseto, tal como um vetor de baculovírus, também pode ser usado.

A fim de inserir o gene da presente invenção em um vetor, pode ser usado, por exemplo, um método no qual o DNA purificado é clivado com uma enzima de restrição apropriada e depois inserido na posição de restrição ou na posição de multiclonagem de um DNA de vetor apropriado para ligação no vetor. O gene da presente invenção deve ser incorporado no vetor de tal modo que a função do gene seja expressada. Para esse fim, a adição a um promotor e ao gene da presente invenção, os que contêm elementos cis, tais como realçador, um sinal de divisão, sinal de poli(A) adição, marcador de seleção, sequência de ligação de ribossoma (sequência de SD) ou similares, podem ser ligados ao vetor da presente invenção, caso desejado. Exemplos de marcadores de seleção são gene de redutase de diidrofolato, gene de tolerância à ampicilina, gene de tolerância à neomicina, e similares.

(2) Preparação de transformantes

Os transformantes da presente invenção podem ser obtidos pela introdução do vetor recombinante da presente invenção em um hospedeiro, de modo que o gene de interesse possa ser expressado. O hospedeiro não está particularmente limitado, desde que o gene da presente invenção possa ser ex-

pressado no mesmo. Exemplos específicos do hospedeiros incluem *Escherichia* bactéria, tal como *E. coli*, bactérias de *Bacillus*, tal como *Bacillus subtilis*; bactérias de *Pseudomonas*; tal como *Pseudomonas putida*; bactérias de *Rhizobium*, tal como *Rhizobium meliloti*; levedos, tais como *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*; variedades de células vegetais, estabelecidas de *Arabidopsis thaliana*, tabaco, milho, arroz ou cenoura etc., ou protoplastos preparados dessas plantas; células animais, tais como células CÓS e células CHO; e células de insetos, tais como células Sf9 e células Sf21.

Quando uma bactéria, tal como *E. coli*, é usada como hospedeiro, o vetor recombinante da presente invenção é capaz de replicação autônoma dentro do hospedeiro e, ao mesmo tempo, está constituído, de preferência, de um promotor, uma sequência de ligação a ribossoma, do gene da presente invenção e de uma sequência de terminação de transcrição. O vetor também pode conter um gene para regular o promotor. Variedades de *Escherichia coli*, tais como HMS174(DE3), K12 ou DH1 podem ser usadas. Variedades de *Bacillus subtilis*, tais como MI114 ou 207-021 podem ser usadas.

Qualquer promotor pode ser usado, desde que ele seja capaz de dirigir a expressão do gene de interesse em um hospedeiro, tal como *E. coli*. Por exemplo, um promotor derivado de *E. coli* ou de fago, tal como promotor de *trp*, promotor de *lac*, promotor de P_L ou promotor de P_R , pode ser usado. Um promotor artificialmente executado e alterado, tal como promotor de *tac*, também pode ser usado. Métodos para introduzir o vetor recombinante em uma bactéria não estão particularmente limitados, e exemplos dos mesmos incluem um método que usa íons de cálcio (Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69:2110-2114, 1972) e eletroporação.

Quando levedo, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, ou *Pichia pastoris*, é usado como hospedeiro, o promotor não está particularmente limitado, e qualquer promotor pode ser usado, desde que ele seja capaz de dirigir a expressão do gene de interesse em levedo. Por exemplo, promotor de *gal1*, promotor de *gal10*, promotor de proteína de choque térmico, promotor de $MF\alpha 1$, promotor de PH05, promotor de PGK, promotor de GAP, promotor de ADH ou promotor de AOX1, podem ser usados.

Um método para introduzir o vetor recombinante em levedo não está particularmente limitado, e exemplos do mesmo incluem eletroporação (Becker, D.M. et al., *Methods Enzymol.* 194:182-187, 1990), o método de esféroplasto (Hinnen, A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1929-1933, 1978) e o método de acetato de lítio (Itoh, H., *J. Bacteriol.*, 153:163-168, 1983).

Quando uma célula vegetal é usada como hospedeiro, por exemplo, são usadas variedades de células estabelecidas de arroz, milho, trigo, *Arabidopsis thaliana*, tabaco, cenoura etc. ou protoplastos preparados dessas plantas. Nesse caso, o promotor a ser usado não está particularmente limitado, desde que seja capaz de dirigir a expressão do gene de interesse em plantas. Exemplos dos mesmos incluem o promotor 35SRNA do vírus de mosaico de couve-flor, promotor do gene rd29A e promotor rbcS.

Um método para introduzir o vetor recombinante em uma planta inclui o método de Abel et al., usando polietilenoglicol (Abel, H. et al., *Plant J.* 5:421-427, 1994) e eletroporação. Quando uma célula animal é usada como hospedeiro, por exemplo, células COS-7 de símio ou células Vero, células de ovário de hamster chinês (células de CHO), células L de camundongo, células GH3 de rato, células FL humanas e promotor de SR α , promotor de SV40, promotor de LTR, promotor de CMV, ou similar, pode ser usada. O promotor de gene primitivo de citomegalovírus humano ou similar também pode ser usado.

Para introduzir o vetor recombinante em uma célula animal, pode ser usado eletroporação, o método de fosfato de cálcio, lipofecção, ou similar. Quando uma célula de inseto é usada como hospedeiro, por exemplo, células Sf9, células Sf21, ou similares, podem ser usadas. O vetor recombinante pode ser introduzido em uma célula de inseto pelo método de fosfato de cálcio, lipofecção, eletroporação ou similar.

4. Produção das proteínas recombinantes de acordo com a presente invenção

A proteína recombinante da presente invenção é uma proteína que tem uma sequência de aminoácido codificada pelo gene da presente invenção ou uma proteína que tem uma sequência de aminoácido com pelo menos uma mutação de aminoácido na sequência de aminoácido descrita

acima e que é capaz de regular a transcrição de genes localizados a jusante de um elemento sensível a estresse.

A proteína da presente invenção pode ser obtida cultivando o transformante em um meio e recuperando a proteína do produto de cultura resultante. O termo "produto de cultura" significa qualquer um dos seguintes materiais: material flutuante de cultura, células cultivadas, micro-organismos cultivados ou células ou micro-organismos desintegrados. O transformante da presente invenção em um meio é cultivado por métodos convencionais para cultivar um hospedeiro.

Como meio para cultivar o transformante obtido de um hospedeiro de micro-organismo, tal como *E. coli* ou levedo, pode ser usado tanto um meio natural como sintético, desde que ele contenha fontes de carbono, fontes de nitrogênio e sais inorgânicos assimiláveis pelo micro-organismo e seja capaz de cultura eficiente do transformante. Quando uma célula vegetal é usada como hospedeiro, vitaminas, tais como tiamina e piridoxina podem ser adicionadas ao meio, caso necessário. Quando uma célula animal é usada como hospedeiro, soro, tal como RPMI1640, pode ser adicionado ao meio, caso necessário.

Exemplos de fontes de carbono incluem: carboidratos, tais como glicose, frutose, sacarose e amido; ácidos orgânicos, tais como ácido acético e ácido propiônico; e álcoois, tais como etanol e propanol. Exemplos de fontes de nitrogênio incluem: amônia, sais de amônio de ácidos inorgânicos ou orgânicos, tais como cloreto de amônio, sulfato de amônio, acetato de amônio e fosfato de amônio; outros compostos que contêm nitrogênio; peptona; extrato de carne e água de maceração de milho.

Exemplos de substâncias inorgânicas incluem: fosfato monopotássico, fosfato dipotássico, fosfato de magnésio, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, sulfato de ferro(II), sulfato de manganês, sulfato de cobre e carbonato de cálcio. Normalmente, a cultura é realizada sob condições aeróbicas (tal como cultura de agitação ou cultura de agitação sob aeração), a aproximadamente 30°C a 37°C, por aproximadamente 6 horas a 3 dias. Durante a cultura, o pH é mantido em aproximadamente 7,0 a 7,5. O pH é ajustado

tado com um ácido inorgânico ou orgânico, uma solução alcalina ou similar.

5 Durante a cultura, um antibiótico, tal como ampicilina ou tetraciclina pode ser adicionado ao meio, caso necessário. Quando um micro-organismo transformado com um vetor de expressão que contém um promotor indutível é cultivado, um indutor pode ser adicionado ao meio, caso necessário. Por exemplo, quando um micro-organismo transformado com um vetor de expressão contendo promotor de Lac é cultivado, isopropil- β -D-tiogalactopiranosida (IPTG) ou similar pode ser adicionado ao meio. Quando um micro-organismo transformado com um vetor de expressão que contém um promotor de

10 trp é cultivado, ácido indolacrílico (IAA) ou similar pode ser adicionado ao meio.

Normalmente, a cultura é realizada na presença de 5% de CO₂, a aproximadamente 30°C a 37°C, por aproximadamente 6 horas a 3 dias. Durante o cultivo, um antibiótico, tal como camamicina ou penicilina, pode ser adicionado ao meio, caso necessário. Depois do cultivo, a proteína da

15 presente invenção é extraída por desintegração do micro-organismo ou célula cultivado, se a proteína é produzida no micro-organismo ou célula. Se a proteína da presente invenção for secretada fora do micro-organismo ou célula, o fluido de cultura pode ser usado para as seguintes etapas, tal como está ou depois de ser submetido a centrifugação, para remover o micro-

20 organismo ou células. Depois, técnicas bioquímicas convencionais usadas para isolamento/purificação de uma proteína, por exemplo, são usadas precipitação de sulfato de amônio, cromatografia de gel, cromatografia de troca de íons e cromatografia de afinidade, independentemente ou em uma combinação apropriada para isolar e purificar a proteína da presente invenção do

25 produto de cultura acima.

5. Preparação de plantas transgênicas, nas quais o gene da presente invenção foi introduzido

Uma planta transgênica tolerante a estresses ambientais e, particularmente estresses por alta temperatura e desidratação, pode ser produ-

30 zida introduzindo DNA que codifica a proteína da presente invenção em uma planta hospedeira por meio de técnicas de engenharia genética. Um método para introduzir o gene da presente invenção em uma planta hospedeira inclui

introdução indireta, tal como o método de infecção de *Agrobacterium*, e introdução direta, tal como o método de pistola de partículas, o método de polietilenoglicol, o método de lipossoma e o método de microinjeção. Quando é usado o método de infecção de *Agrobacterium*, a planta transgênica da presente invenção pode ser produzida pelo seguinte procedimento.

5 (1) Preparação de um vetor recombinante a ser introduzido em uma planta e transformação de *Agrobacterium*

Um vetor recombinante a ser introduzido em uma planta pode ser preparado dividindo DNA que compreende os genes da presente invenção com uma enzima de restrição apropriada, ligando um ligante apropriado ao DNA resultante, caso necessário, e inserindo o DNA em um vetor de clonagem para o hospedeiro de célula vegetal. Um plasmídio do tipo de vetor binário, tal como Pbi2113Not, pBI2113, pBI01, pBI121, pGA482, pGAH ou pBIG, ou um plasmídio do tipo de vetor intermediário, tal como pLGV23Neo, pNCAT ou pMON200, podem ser usados como vetores de clonagem.

Quando um plasmídio do tipo de vetor binário é usado, o gene de interesse é inserido entre as sequências de borda (LB, RB) do vetor binário. O vetor recombinante resultante é amplificado em *E. coli*. O vetor recombinante amplificado é depois introduzido na *Agrobacterium tumefaciens* C58, LBA4404, EHA101, C58CIRif^R, EHA105 etc. por congelação-degelo, eletroporação ou similar. A *Agrobacterium* resultante é usada para a transformação da planta de interesse.

Na presente invenção, o método de conjugação de três membros (Nucleic Acids Research 12:8711, 1984) também pode ser usado, além do método descrito acima para preparar uma *Agrobacterium* que contém o gene da presente invenção para infecção de plantas. Especificamente, *E coli* contendo plasmídio que compreende o gene de interesse *E. coli* que contém plasmídio adjuvante (por exemplo, pRK2013) e *Agrobacterium* são misturados e cultivados em um meio que contém rifampicilina e canamicina. Desse modo, pode ser obtido *Agrobacterium* zigoto para infectar plantas.

Para a expressão de um gene estranho e similar em um corpo de planta, um promotor e um terminador para plantas devem ser localizados,

em cada caso, a montante e a jusante do gene estrutural. Exemplos específicos de promotores que podem ser utilizados na presente invenção incluem o transcrito 35S derivado do vírus de mosaico de couve-flor (CaMV) (Jefferson, R.A. et al., The EMBO J. 6:3901-3907, 1987); o promotor para o gene de ubiquitina de milho (Christensen, A.H. et al., Plant Mol. Biol. 18:675-689, 1992); o promotor para o gene de sintase de nopalina (NOS); e o promotor para o gene de sintase de octopina (OCT). Exemplos específicos de terminadores úteis incluem terminadores derivados de CaMV e terminadores derivados de NOS. Promotores e terminadores não estão limitados aos exemplos acima mencionados, desde que se saiba que funcionam em corpos de plantas.

Se o promotor usado em uma planta transgênica for um promotor responsável para a expressão constitutiva do gene de interesse (por exemplo, promotor 35S de CaMV) e o uso do mesmo tiver causado retardamento no crescimento ou retardamento da planta transgênica, um promotor que dirige a expressão transitória do gene de interesse (por exemplo, promotor do gene rd29A) pode ser usado. Caso necessário, uma sequência de íntron, que intensifica a expressão do gene da presente invenção pode ser localizado entre a sequência de promotor e o gene. Por exemplo, o íntron de desidrogenase de álcool de milho (Adh1) (Genes & Development 1:1183-1200, 1987) pode ser introduzido.

A fim de selecionar eficientemente células transformadas de interesse, é preferível usar um gene marcador de seleção eficiente, em combinação com o gene da presente invenção. Como marcador de seleção, um ou mais genes selecionados do gene de tolerância a canamicina (NPTII), o gene de fosfotransferase de higromicina (hpt), que confere tolerância ao antibiótico higromicina em plantas, o gene de fosfinotricina acetil transferase (bar), que confere tolerância a bialafos e similar pode ser usado. O gene da presente invenção e o gene marcador de seleção podem ser incorporados, juntos, em um único vetor. Alternativamente, dois tipos de DNAs recombinantes, incorporados em vetores separados, podem ser usados.

(2) Introdução do gene da presente invenção em um hospedeiro

Na presente invenção, embora o hospedeiro para o transforman-

te não esteja particularmente limitado, é, de preferência, uma planta. A planta pode ser composta de quaisquer células de planta cultivadas, o corpo de planta inteiro de uma planta cultivada, órgãos de plantas (tais como folhas, pétalas, hastes, raízes, rizomas ou sementes), ou tecidos de plantas (tais como epiderme, floema, parênquima, xilema ou feixe vascular). As plantas são, de preferência, plantas monocotiledôneas, tais como arroz, milho e trigo. Quando uma célula de planta cultivada, corpo de planta, órgãos de planta ou tecido de planta é usado como hospedeiro, o método de infecção de *Agrobacterium*, o método de pistola de partículas, ou o método de polietilenoglicol pode ser usado para introduzir o DNA que codifica a proteína da presente invenção para transformar essa planta hospedeira pela introdução de um vetor em seções de plantas. Alternativamente, um vetor pode ser introduzido em um protoplasto por eletroporação, para produzir uma planta transformada.

Por exemplo, quando um gene é introduzido em *Arabidopsis thaliana* pelo método de infecção de *Agrobacterium*, a etapa de infectar a planta com um plasmídio contendo *Agrobacterium*, que compreende o gene de interesse, é essencial. Essa etapa pode ser realizada pelo método de infiltração por vácuo (CR Acad. Sci. Paris, Life Science, 316:1194, 1993).

Especificamente, *Arabidopsis thaliana* é cultivado em solo composto de partes equivalentes de vermiculita e perlita. O *Arabidopsis thaliana* é imerso diretamente em um fluido de cultura de *Agrobacterium*, contendo um plasmídio, que compreende o gene da presente invenção, o milho cultivado é colocado em um dessecador, e o produto resultante é depois aspirado com uma bomba a vácuo para 65-70 mmHg. Depois, deixa-se a planta em repouso à temperatura ambiente por 5-10 min. O vaso de planta é transferido para uma bandeja, que é coberta com uma cobertura para manter a umidade. No dia seguinte, a cobertura é removida. A planta é cultivada nesse estado até ter sementes de colheita.

Subsequentemente, as sementes são semeadas em meio de ágar de MS, suplementado com antibióticos apropriados para selecionar as plantas que têm o gene de interesse. Plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas nesse meio são transferidas para vasos e ali cultivadas. Como resul-

tado, podem ser obtidas as sementes de uma planta transgênica, na qual o gene da presente invenção foi introduzido. Em geral, os genes são introduzidos no genoma da planta hospedeira de maneira similar. Porém, devido a diferenças nas posições específicas no genoma no qual os genes foram introduzidos, a expressão dos genes introduzidos varia. Esse fenômeno é chamado de "efeito de posição". Testando os transformantes com fragmentos de DNA do gene introduzido como uma sonda por Northern blotting, é possível selecionar os transformantes, nos quais o gene introduzido está expressado a um nível mais alto.

10 A confirmação de que o gene de interesse foi integrado na planta transgênica, na qual o gene da presente invenção foi introduzido e nas plantas da geração subsequente da mesma, pode ser feita extraíndo DNA de células e tecidos dessas plantas e detectando o gene introduzido por PCR ou análise Southern, que são métodos convencionais na técnica.

15 (3) Análise do nível de expressão e posição de expressão do gene da presente invenção em tecidos de plantas

O nível de expressão e a posição de expressão de um gene em uma planta transgênica, na qual o gene da presente invenção foi introduzido, podem ser analisados extraíndo RNA das células e tecidos da planta e detectando do mRNA do gene introduzido por RT-PCR ou análise Northern, que são métodos convencionais na técnica. Alternativamente, o nível de expressão e a posição de expressão podem ser analisados diretamente por Western blotting ou similar do produto de gene da presente invenção usando um anticorpo contra o produto acima.

25 (4) Alterações nos níveis de mRNA de diversos genes em uma planta transgênica, na qual foi introduzido o gene da presente invenção

É possível identificar por hibridização Northern os genes, cujos níveis de expressão podem ter se alterado, como resultado da ação do fator de transcrição da presente invenção em uma planta transgênica, na qual foi introduzido o gene da presente invenção.

30 Por exemplo, plantas cultivadas hidroponicamente ou similar são submetidas a estresse ambiental por um período de tempo específico (por

exemplo, 1 a 2 semanas). Exemplos de estresses ambientais incluem estresses por alta temperatura, desidratação e sal. Por exemplo, a estresse por desidratação pode ser imposta arrancando a planta do meio hidropônico e secando a mesma sobre um papel de filtro por 10 minutos a 24 horas. A estresse por alta temperatura pode ser imposta mantendo a planta a 30°C a 50°C por 10 minutos a 24 horas. Estresses por sal podem ser impostas, por exemplo, substituindo o meio hidropônico com uma solução de NaCl de 50 a 500 mM e mantendo a planta por 10 minutos a 24 horas.

RNAs totais são preparados separadamente de uma planta de controle, que não foi submetida a nenhuma estresse, e os RNAs totais resultantes são submetidos a eletroforese. Os padrões de expressão podem ser analisados por hibridização Northern, usando a sonda do gene a ser observado.

(5) Avaliação da tolerância da planta transgênica a estresses ambientais

A tolerância a estresses ambientais da planta transgênica, na qual foi introduzido o gene da presente invenção, pode ser avaliada colocando a planta transgênica em um vaso contendo um solo constituído de vermiculita, perlita e similar, expondo a planta a diversas estresses ambientais e examinando a sobrevivência da planta. Estresses ambientais incluem estresses por alta temperatura, desidratação e sal. Por exemplo, tolerância à estresse por desidratação pode ser avaliada deixando a planta sem irrigação por 2 a 4 semanas e depois examinando a sobrevivência. A tolerância à estresse por alta temperatura pode ser avaliada deixando a planta a 30°C a 50°C por 30 minutos a 10 dias, cultivando a planta a 20°C a 30°C por 2 dias a 3 semanas, e depois examinando a taxa de sobrevivência. A tolerância à estresse por sal pode ser avaliada, por exemplo, deixando a planta em 200 a 600 mM de NaCl por 1 hora a 7 dias, cultivando a mesma a 20°C a 35°C por 1 a 3 semanas, e depois examinando sua taxa de sobrevivência.

6. Determinação de níveis de estresse em plantas

A transcrição do gene de acordo com a presente invenção é ativada por estresse por baixa temperatura, estresse por desidratação, estresse por sal ou estresse por alta temperatura. Portanto, a determinação do nível de transcrição do gene da presente invenção possibilita a determinação do nível

de estresse, tal como referente a estresse por baixa temperatura, estresse por desidratação, estresse por sal ou estresse por alta temperatura, à qual a planta está submetida.

O nível de transcrição do gene de acordo com a presente invenção pode ser determinado, por exemplo, por análise de blot de gel de RNA, ou PCR quantitativo. Uma sonda a ser usada na análise de blot de gel de RNA pode ser produzida de acordo com qualquer método convencional, baseado no gene de acordo com a presente invenção e/ou uma região de 100-1000 bp, que compreende uma sequência específica adjacente ao gene. Um iniciador a ser usado em PCR quantitativo pode ser preparado por qualquer método convencional, com base na sequência na região que codifica o gene da presente invenção ou na região adjacente à mesma.

A sonda ou iniciador descritos acima podem ser usados em um kit para determinar o nível de transcrição do gene de acordo com a presente invenção.

7. Outros

Além disso, a proteína de acordo com a presente invenção pode ser utilizada produzindo um anticorpo contra a proteína. O anticorpo pode ser um anticorpo policlonal ou monoclonal. O método para produzir um anticorpo não está particularmente limitado e pode ser realizado de acordo com qualquer método convencional (veja, por exemplo, Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). O anticorpo pode ser utilizado, por exemplo, na detecção da proteína de interesse por Western blotting ou imunoprecipitação.

25 EXEMPLOS

A presente invenção é descrita mais detalhadamente com referência aos seguintes exemplos, embora o alcance da presente invenção não esteja limitado aos mesmos.

Exemplo 1: Isolação do gene ZmDREB2A

30 1. Pesquisa de homologia em banco de dados

Com base na sequência do domínio de AP2/ERF, a pesquisa de homologia foi realizada usando BLAST em bancos de dados de DNA de mi-

lho do GenBank, e diversas sequências de EST foram obtidas. Com base na sequência de EST mais longa, foram criados os seguintes iniciadores para RT-PCR, e dois tipos de cDNAs foram obtidos de RNA de milho por meio de RT-PCR.

5 Iniciadores para isolamento de ZmDREB2A

AY108198 Avanço: 5'-GGTCTTATCGACTCCAACAAGAAC-3' (SEQ ID NO: 5)

AY108198 Inversão: 5'-AAAAGCAAGCACTCTTTTAA-3' (SEQ ID NO: 6)

O cDNA de comprimento total de ZmDREB2A foi submetido a sequenciação de nucleotídeo usando o Sequenciador de DNA 377 (Perkin-Elmer). Além disso, ORF foi analisado para determinar todas as sequências de aminoácido.

Como resultado, a sequência de nucleotídeo do gene de ZmDREB2A (forma curta: SEQ ID NO: 1, forma longa: SEQ ID NO: 3) e a sequência de aminoácido correspondente da proteína de ZmDREB2A (forma curta: SEQ ID NO: 2, forma longa: SEQ ID NO: 4) foram identificadas. O cDNA mais longo dos dois tipos de cDNAs identificados (isto é, a forma longa) compreendeu um íntron de 53 bp, e o cDNA mais curto (isto é, a forma curta) não compreendia o íntron. No cDNA de forma longa, ocorreu uma mudança de estrutura no íntron, e o ORF era muito curto. O cDNA de forma curta apresentou uma estrutura do tipo DREB. A figura 1A mostra a sequência de nucleotídeo do cDNA de forma longa e a figura 1B mostra a sequência de nucleotídeo do cDNA de forma curta e uma sequência de aminoácido putativa do mesmo. Tal como descrito abaixo, esse cDNA de forma curta funciona como uma forma ativa do gene de ZmDREB2A.

25 Exemplo 2: Análise da expressão do gene de ZmDREB2A em uma planta não transgênica

Características de expressão do gene de ZmDREB2A em milho foram analisadas por meio de análise Northern, RT-PCR e análise Southern.

1. Materiais e método

30 (1) Condições para cultivo de milho

Sementes de milho (variedade: Golden Cross Bantam) foram tratadas com 70% de etanol por 5 minutos, lavadas cuidadosamente com

água e colocadas em uma tela de aço inoxidável. A tela foi introduzida em um recipiente contendo água, e as sementes foram cultivadas em uma incubadora a 26°C, com um fotoperíodo de 12 horas.

(2) Aplicação de estresse

5 As plantas que foram cultivadas hidroponicamente por 1 semana foram submetidas às seguintes aplicações de estresse.

Estresse por baixa temperatura: a tela de aço inoxidável, com sementes sobre a mesma, foi transferida para água que foi previamente refrigerada para 4°C, e o material resultante foi tratado nesse estado em uma
10 incubadora a 4°C.

Estresse por alta temperatura: a tela de aço inoxidável, com sementes sobre a mesma, foi transferida para água que foi previamente aquecida para 42°C, e o material resultante foi tratado nesse estado em uma incubadora a 37°C.

15 Estresse por sal: a tela de aço inoxidável com sementes sobre a mesma foi tratada com uma solução de NaCl de 250 mM, e o material resultante foi tratado em uma incubadora a 26°C.

Estresse por desidratação: as plantas foram batidas levemente e secadas em uma toalha Kim, depois que as raízes foram cuidadosamente
20 drenadas.

Essas plantas foram tratadas por 0 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 40 minutos, 1 hora, 2 horas, 5 horas e 24 horas, recuperadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e depois armazenadas a -80°C.

(3) Extração de RNA

25 Enquanto as plantas, que foram submetidas a estresse, foram mantidas em um estado congelado, foram desintegradas usando o agitador principal (BMS-12, Tommy), e o RNA foi extraído usando um líquido Trizol (Invitrogen) de acordo com uma técnica convencional.

(4) Análise Northern

30 O RNA extraído (6 µg) foi isolado, 19 µl de corante Northern (0,1% de BPB, 1 x de tampão de eletroforese de RNA, 20% de formaldeído, 60% de formamida, 0,033 µl/µl de EtBr) foi adicionado ao mesmo, e o mate-

rial resultante foi tratado a 65°C por 15 minutos, seguido de resfriamento para desnaturação.

O RNA preparado foi aplicado a um gel, e o material resultante foi eletroforado em 1x de tampão de eletroforese de RNA (0,02 M de MOPS, 8 mM de acetato de sódio, 1 mM de EDTA) a 90 V por 2,5 horas. O produto foi transferido para uma membrana de náilon (Hybond-XL, Amersham) usando 20x de SSC durante a noite, secado ao ar por 1 hora, e tratado sob pressão reduzida a 80°C por 2 horas.

Os iniciadores foram preparados de tal modo que uma região de cerca de 500 bp no terminal C específico para ZmDREB2A tornou-se uma sonda. As sequências de iniciador são tais como mostradas na tabela 1. Usando esses iniciadores, as sondas foram preparadas por PCR. A composição da solução de PCR (quantidade total: 20 µl) era tal como mostrada abaixo e a solução foi preparada de acordo com o protocolo da polimerase de DNA de KOD plus (TOYOBO).

Condição de reação

10 x tampão	2,0 µl
2 mM de dNTPs	2,0 µl
25 mM de MgCl ₂	0,8 µl
20 10 pmol de iniciador de avanço	1,0 µl
10 pmol de iniciador de inversão	1,0 µl
Plasmídio de solução de DNA	1,0 µl
polimerase KOD plus	0,4 µl

Condições de PCR

25 95°C por 15 minutos
95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos, e 68°C por 30 segundos x 25 ciclos
68°C por 7 minutos

O grupo foi confirmado por meio de eletroforese, dividido e purificado. O grupo purificado foi marcado com o Kit de Marcação de BcaBEST (TaKaRa) e usado como uma sonda. Água destilada foi adicionada a uma mistura de 2 µl de iniciador "randam", e 25 ng de solução de DNA de gabarito para sonda, para perfazer a quantidade total de 14 µ. O material resultan-

te foi aquecido para 95°C por 3 minutos, e o material resultante foi depois resfriado em gelo por 5 minutos, para desnaturação. 10x de tamponador (2,5 µl), dNTP (2,5 µl), polimerase de DNA (1 µl) e [α -³²P] dCTP (5 µl) foram adicionados, e a mistura foi tratada a 55°C por 10 minutos. Depois da reação, o produto de reação foi aplicado à coluna Sephadex G50 (Pharmacia) para separar uma sonda marcada de [α -³²P]dCTP.

A membrana para a qual foi transferido o RNA foi introduzida em um tubo de vidro, a membrana foi lavada com água destilada e 5 x de solução de SSC (80 mM de Na Cl e 80 mM de citrato de sódio), 30 ml de um tampão de hibridização (0,5 M de Na₂HPO₄.12H₂O, 0,5M de NaH₂PO₄.2H₂O, 7% de SDS e 10 mM de EDTA) foi adicionado e a pré-hibridização foi realizada a 65°C por pelo menos 30 minutos. Subsequentemente, a solução foi descartada, sondas marcadas foram adicionadas a 30 ml de um tampão de hibridização fresco para uma concentração de 1,0 x 10⁶ dpm/ml, e a hibridização foi realizada a 65°C durante a noite.

A membrana foi lavada com uma solução e lavagem 1 (1x SSC e 1x SDS) a 65°C por 5 min e depois com uma solução de lavagem 2 (0,1x SSC e 0,1 SDS) duas vezes por 30 minutos e uma vez por 5 minutos. Depois de a membrana ter sido secada ao ar por pelo menos 1 hora, o sinal foi detectado. A análise do sinal foi realizada usando o Analisador de Imagens BAS2000 (Fuji Film).

(5) Análise quantitativa de RT-PCR

A diferença entre o comprimento da forma longa e o da forma curta é de apenas 53 bp. Consequentemente, os sinais não podem ser distinguidos por meio de análise Nortehr. A fim de analisar separadamente cada expressão, portanto, iniciadores específicos para a forma longa e para a forma curta foram preparados e a análise quantitativa de RT-PCR foi realizada.

cDNA foi sintetizado usando o kit ReverTra Ace (Toyobo). A tabela 1 mostra as sequências de iniciadores específicos para o cDNA de forma longa e para o cDNA de forma curta.

Como um aparelho para RT-PCR quantitativo, foi usado o Light Cycler (Roche) e SYBR Green Ex taq (TaKaRa) foi usado como agente de

reação. 2 x SYBR (5 µl), 2 pmol do iniciador de avanço, 2 pmols do iniciador de inversão, e 3,5 µl de água MilliQ foram adicionados ao cDNA de gabarito (1 µl de ZmDREB2A e 0,001 µl de 18 SrRNA), e a reação foi deixada prosseguir. 18 SrRNA foi usado como um padrão interno. Tabela 1 mostra as sequências dos iniciadores usados.

Tabela 1

	Nomes dos iniciadores	Sequências (5'→3')
Northern		
ZmDREB2A	AY108198-sonda-for	GGGTCTAGAATGCCGATGCAGCCCC
	AY108198-sonda-rev	GGGGGATCCTCAGTTTAGCCGCTCC
RT-PCR		
18SrRNA	18SrRNA avanço	AAACGGCTACCACATCCAAG
	18SrRNA inversão	CCTCCAATGGATCCTCGTTA
rd29A	rd29A avanço	TGGACACGAATTCTCCATCA
	rd29A avanço	TTCCAGCTCAGCTCCTGATT
forma longa	AY108198-longo156F	GATGACAGCTGCCACTGACGTA
	AY108198-longo128R	CGTAGGCCCATCTCGTGATC
forma longa	AY108198-curto24F	GCAGCCCGGAAGGAAGAA
	AY108198-curto90R	GATGACAGCTGCCACTGACGAT

* De cima para baixo, as sequências de iniciador mostradas na tabela 1 são as das SEQ ID NOS: 7 a 16 na Relação de Sequências.

Condições de PCR

10 95°C por 10 segundos

95°C por 5 segundos, 60°C por 20 segundos e 74°C por 5 segundos x 40 ciclos

Subsequentemente, a amplificação da sequência de nucleotídeos putativa foi confirmada por análise da temperatura de fusão do produto de amplificação.

15 A fim de quantificar os níveis de expressão, o vetor pBlueScript, que compreende os cDNAs de forma longa e forma curta de concentrações conhecidas incorporados no mesmo, foi usado para preparar uma curva de calibração. A concentração determinada com base nessa curva de calibração foi dividida por um padrão interno para determinar os níveis de expres-

são relativos.

(6) Análise Southern

A análise genômica Southernm foi realizada a fim de determinar o número de cópias de ZmDREB2A do genoma de milho.

5 Os iniciadores e o kit usados eram os mesmos como os usados em (4) acima. DNA genômico foi extraído de uma folha de milho de acordo com o método de CTAB.

DNA extraído (10 µg) foi tratado com 10 µl de cada uma das enzimas de restrição *Bam*HI, *Dra*I e *Hind*III (TaKaRa) a 37°C, durante a noite.
 10 DNA foi recuperado da solução por meio de precipitação com etanol e dissolvido em 300 µl de solução de TE. O produto foi eletroforado em gel de agarose de 1% (1x TBE) a 70 V por 6,5 horas. O material resultante foi sucessivamente submetido à desnaturação com ajuda de uma solução ácida (0,25N HCl), uma solução de desnaturação (0,5N NaOH e 1,5M NaCl), e
 15 uma solução de neutralização (0,5 M Tris-HCl e 1,5 M NaCl), nessa ordem, e o produto desnaturado foi transferido para uma membrana de náilon (Amersham) durante a noite.

A membrana sobre a qual o produto desnaturado foi transferido foi submetida a hibridização com uma sonda. A mesma sonda tal como a
 20 usada na análise Northern foi usada. Esses procedimentos estão de acordo com os da análise Northern; mas, a lavagem foi realizada de 2 maneiras, tal como abaixo:

sob condições de baixa constrição: 0,5x de SSC, 0,5x de SDS, 50°C (duas vezes por 30 minutos);

25 sob condições de alta constrição: 0,1x de SSC, 0,1x de SDS, 65°C (duas vezes por 30 minutos).

2. Resultados

(1) Análise Northern

Plantas que foram cultivadas hidroponicamente por 1 semana
 30 após a semeadura foram submetidas a diversos tipos de aplicação e estresse e RNA extraídos dessas plantas foi usado para realizar uma experiência. A análise de expressão foi realizada pelo método Northern usando regiões

específicas de ZmDREB2A como sondas (figura 2A). Quando estresse por temperatura baixa foi aplicada a ZmDREB2A, a indução de expressão foi observada 2 horas depois e uma expressão consideravelmente forte foi observada 5 horas depois. Quando foi aplicada estresse por alta temperatura, a indução da expressão foi observada com tratamento a 42°C. No caso de indução da expressão por alta temperatura, foi confirmado que uma forte expressão foi induzida por 10 a 20 minutos de tratamento e que o nível de expressão foi gradualmente baixado, depois disso. Quando estresse por desidratação foi aplicada, foi observada uma expressão constante e fraca; porém, o nível da indução de expressão não era significativo. Quando foi aplicada estresse por sal, uma expressão um tanto forte foi observada na raiz, 10 minutos após a aplicação da estresse, e a expressão ficou mais forte com o decorrer do tempo.

A expressão de ZmDREB2A foi observada, principalmente, na raiz, quando da aplicação de cada tipo de estresse, e a expressão não era significativa na haste e na folha. Porém, foi observada indução de expressão na folha, quando da aplicação de estresse por baixa temperatura e alta temperatura.

Isso demonstra que a expressão de ZmDREB2A é induzida quando da aplicação de estresse e que os padrões de expressão do mesmo variam dependendo do tipo de estresse.

(2) Análise de RT-PCR quantitativa

O iniciador de avanço do cDNA de forma curta compreende uma sequência parcialmente homóloga à do cDNA de forma longa. Confirmou-se que esses iniciadores funcionam de um modo específico para sequência. O cDNA de forma longa e o cDNA de forma curta foram usados como gabaritos, o PCR foi realizado adicionando esses iniciadores e a solução de reação foi eletroforada em gel de agarose de 2%. Como resultado, constatou-se que esses iniciadores amplificam sequências em um modo específico para gabarito.

Os iniciadores idênticos (AY108198 cDNA BamHI e AY108198 R90 mais curto) estavam presentes fora do íntron, e dois fragmentos de comprimento diferente foram amplificados simultaneamente. Desse modo, foi confirmado se 2 tipos de mRNAs foram, ou não, efetivamente acumula-

dos (figura 2B). Exceto pelo controle, a formação de 2 grupos de eletroforese foi observada quando da aplicação de cada tipo de estresse. Como tanto os cDNAs de forma longa como os de forma curta desenvolvem grupos na mesma posição com o controle positivo, esses grupos foram confirmados
5 como sendo cDNAs de forma longa e forma curta, e a presença de 2 tipos de clones foi confirmada.

Além disso, foram analisadas mudanças na acumulação de mRNA ao longo do tempo (figs. 3A e 3B). Sem aplicação de estresse, substancialmente nenhuma expressão foi observada nos dois mRNAs. Quando o
10 mRNA de forma longa foi comparado com o mRNA de forma curta, verificou-se que a quantidade do mRNA de forma longa era 1.000 vezes mais do que a do mRNA de forma curta. A expressão dos mesmos foi induzida por aplicação de estresse. No total, o nível de expressão do mRNA de forma mais longa era mais alto, o nível de expressão do mRNA de forma curta tornou-se muito alta
15 quando da aplicação de estresse, e a quantidade de mRNA de forma curta acumulada ocasionalmente era maior do que do mRNA de forma longa, tal como com a aplicação de estresse por alta temperatura por 10 minutos.

(3) Análise Southern

Análise de Southern genômica foi realizada a fim de determinar
20 o número de cópias do ZmDREB2A do genoma de milho (figura 4). Tal como no caso da análise Northern, uma região terminal C de ZmDREB2A foi usada como sonda. A fim de inspecionar a presença de genes altamente homólogos, a lavagem de membrana foi realizada de 2 modos, isto é, sob condições altamente constritivas e sob condições de baixa constrição. Como ape-
25 nas 1 grupo foi observado por meio do tratamento sob condições altamente constritivas, o número de cópias de ZmDREB2A foi considerado como sendo apenas 1. Sob condições de baixa constrição, porém, foram detectados diversos grupos. Isso indica a presença de vários genes altamente homólogos.

3. Exame

30 O mRNA de ZmDREB2A de *Arabidopsis thaliana* é induzido por estresse por desidratação, sal ou alta temperatura. Tal como com o caso de DREB2A, a expressão de ZmDREB2A frequentemente foi induzida por estresse por sal

ou alta temperatura (figura 2A). Em contraste, a expressão do mesmo não foi induzida, substancialmente, pela estresse por desidratação, e a expressão do mesmo induzida por estresse por baixa temperatura ocorreu em um tempo consideravelmente tardio. Esse padrão de expressão difere do de DREB2A. Quando estresse por desidratação foi aplicada a *Arabidopsis thaliana*, o nível de expressão era continuamente fraco, de 20 minutos a 2 horas depois da aplicação de estresse, o nível de expressão ficou consideravelmente forte 5 horas após a aplicação de estresse, e atingiu o pico cerca de 10 horas após a aplicação de estresse, e o nível de expressão após a aplicação de estresse era substancialmente igual ao de 5 horas após a aplicação de estresse (Liu et al. The Plant Cell 10, 1391-1406, 1998, Nakashima et al., Plant Molecular Biology 42, 657-65, 2000). Em contraste, a expressão de OsDREB2A em arroz, por ocasião da aplicação da estresse por desidratação era constantemente, em vez de transitoriamente, um tanto forte (Dubouzet et al., descrito acima). Embora o padrão de expressão de ZmDREB2A seja similar ao do arroz, o nível de expressão do mesmo é muito mais fraco. *Arabidopsis thaliana* e arroz estavam quase completamente desidratados 5 horas após a aplicação de estresse; entretanto, milho não foi suficientemente desidratado 5 horas após a aplicação de carga. Isso indica que o milho é fortemente resistente à estresse por desidratação. Embora ZmDREB2A fosse sensível à desidratação, as condições no espaço de 24 horas após a aplicação da estresse por desidratação não foram consideradas como suficientes. Consequentemente, a expressão do mesmo não foi observada.

A expressão de ZmDREB2A foi induzida, principalmente, na raiz. Mas, quando a temperatura foi modificada, a expressão também foi observada na folha e na haste. Estresse por sal foi aplicada embebendo a parte do subsolo da planta em uma solução de cloreto de sódio, e a estresse por desidratação foi aplicada removendo a planta que havia sido submetida ao cultivo hidropônico; uma vez, de uma tela de aço inoxidável. tal carga foi aplicada mais fortemente a parte do subsolo. No caso da estresse por temperatura, a folha e a haste também recebem essa estresse e, desse modo, a expressão de ZmDREB2A é induzida nessas partes. Embora o nível de ex-

pressão de ZmDREB2A seja forte na raiz, a expressão do mesmo é observada ao longo de toda a planta e a expressão é induzida imediatamente ao receber a estresse.

Foi inspecionado como os mRNAs de forma longa e forma curta de ZmDREB2A estavam acumulados (figura 3). A expressão dos dois tipos de mRNAs foi induzida por aplicação de estresse; mas, a expressão de mRNA de forma curta tinha mais probabilidade de ser induzida. O mRNA de forma longa tem um íntron, e um códon de parada está presente na parte de íntron. Consequentemente, a síntese de proteína é considerada como tendo sido terminada. Desse modo, é necessário mRNA de forma curta quando estresse é aplicada. Também foram acumuladas quantidades maiores de mRNAs de forma curta, que são consideradas como sendo formas ativas (isso é examinado no exemplo 3), à medida que a estresse se tornou mais forte. A quantidade de mRNAs de forma curta é de cerca de 1/1.000 a dos mRNAs de forma longa, quando nenhuma estresse é aplicada; mas, a quantidade dos mesmos é aumentada quando da aplicação de estresse (figura 3B). Isso sugere que mRNA de forma curta, ativo, é um gene que é necessário quando o nível de estresse é alto. Quando é aplicada estresse por baixa temperatura, a acumulação de mRNAs de forma longa, não ativos, é aumentada com o decorrer do tempo, mas a acumulação de mRNAs de forma curta não é muito significativa. Isso indica que a atividade de uma enzima, necessária quando o mRNA de forma curta é formado de mRNA de forma longa, é diminuída por estresse por baixa temperatura (Figura 3A).

Exemplo 3: Exame do mecanismo ativador de transcrição usando protoplasto

25 1. Material e método

(1) Células cultivadas

Foram usadas células T87 cultivadas de *Arabidopsis thaliana*. Foram obtidas células armazenadas no Centro de BioRecursos do Instituto de Pesquisas Físicas e Químicas.

30 (2) Método de subcultura e meio

As composições do meio de crescimento (meio JPL) são mostradas abaixo. A cultura e a subcultura foram realizadas a 22°C, com a apli-

cação contínua de uma luz branca, sob condições de agitação moderadas. Nessa experiência, foram usadas células que haviam sido subcultivadas por 5 a 6 dias.

Matérias-primas:

5	Matéria-prima A	<u>Concentração (g/l)</u>
		KNO ₃ 65,5
		CaCl ₂ •H ₂ O 4,4
		MgSO ₄ •7H ₂ O 3,7
		<u>KH₂PO₄ 1,7</u>
10	Materia-prima B	<u>Concentração (g/l)</u>
		H ₃ BO ₃ 6,2
		MnSO ₄ •4H ₂ O 22,3
		ZnSO ₄ •7H ₂ O 10,6
15		KI 0,83
		Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O 0,25
		CoCl ₂ •6H ₂ O 0,025
		<u>CuSO₄•5H₂O 0,025</u>
20	Materia-prima C	<u>Concentração (g/l)</u>
		FeSO ₄ •7H ₂ O 2,78
		<u>Na₂EDTA□2H₂O 3,72</u>
	Materia-prima D	<u>Concentração (g/l)</u>
25		Mio-inositol 10
		Glicina 0,2
	Materia-prima VT	<u>Concentração (g/l)</u>
		Ácido nicotínico 0,5
30		Piridoxina-HCl 0,5
		<u>Tiamina-HCl 0,4</u>
	100 mM	
	Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	<u>Concentração (g/l)</u>
35		Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O 71,62
		<u>0,2M KH₂PO₄ 27,22</u>

As soluções de matéria-prima acima e outros reagentes foram

misturados do seguinte modo, para preparar o meio de crescimento

		Por litro
	Matéria-prima A	30 ml
	Matéria-prima B	0,3 ml
5	Matéria-prima C	2 ml
	Matéria-prima D	10 ml
	Matéria-prima V.T.	1 ml
	Ácidos casamínicos	0,1 g
	Sacarose	15 g
10	100 mM Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	1 ml
	500 µM NAA	2 ml

(3) Preparação do construtor (mutante de remoção)

Foi usado o vetor pGreenII E135Ω. Um mutante de remoção foi preparado por meio de PCR de duas fases, com o uso de 2 pares de iniciadores (um par do iniciador A e iniciador B e um par do iniciador C e iniciador D), de acordo com uma técnica convencional. Os iniciadores foram preparados de partes a serem removidas de um mutante de remoção do terminal C e PCR geral foi realizado. O vetor pGreenII foi tratado com *EcoRV* e *BamHI* a 30°C, durante a noite, e um fragmento de alvo foi inserido no mesmo. O fragmento de alvo foi amplificado pelo uso de iniciadores por PCR, tratado com *EcoRV* e *BamHI* a 30°C, durante a noite, e ligado usando Ligation high (Toyobo). O plasmídeo foi introduzido em *E. coli* DH5α, para obter uma variedade tolerante a canamicina. *E. coli* foi transformado pelo método de choque térmico. O material resultante foi cultivado em meio de LB contendo 25 mg/ml de canamicina, durante a noite, para selecionar uma variedade tolerante. A variedade selecionada foi submetida à extração de plasmídeo, usando um separador de DNA automático (PI-100, Kurabo). Além disso, o material resultante foi tratado com RNase a 37°C, por 1 hora, purificado por extração com fenol/clorofórmio e precipitação de etanol, e depois sequenciado usando um sequenciador (ABI3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystem Japan). Os iniciadores usados são mostrados nas tabelas 2 a 4.

Tabela 2

Mutantes de remoção	Nome dos iniciadores	Sequências (5'→3')
Longo cDNA	AY108198-cDNA-BamH I	TTTGGATCCGGTCTATCGACTCC
	AY108198-Longo-rev	AAAAGCAAGCACTCTTTTTA
Longo ORF	AY108198-Longo-BamHI	GGGGGATCCATGAAGGGAAAAGG
	AY108198-SmaI-rev	AAACCCGGGTTCAGTTTAGCCGCTCC
Curto cDNA	AY108198Curto-BamH I	GGGGGATCCATGACGCTGGATCAGA
	AY108198-Longo-rev	AAAAGCAAGCACTCTTTTTA
Curto ORF	AY108198Curto-BamH I	GGGGGATCCATGACGCTGGATCAGA
	AY108198-SmaI-rev	AAACCCGGGTTCAGTTTAGCCGCTCC

* De cima para baixo, as sequências mostradas na tabela 2 são as de SEQ ID NOS: 17 a 24 da relação de sequências

Tabela 3

Mutantes de remoção	Nome dos iniciadores	Sequências (5'→3')
Iniciador de avanço		
Comm	AY108198 Curtot-BamH I	<u>GGGGGATCCATGACGCTGGATCAGAA</u>
Iniciador de reversão		
ZmDREB2A (1-272)	D2-curto-del1	<u>GGGTC</u> ACTCATCAAGACACCAGGGC
ZmDREB2A (1-235)	D2-curto-del2	<u>GGGTC</u> ATGGAAGATTTGTGATAGGCT
ZmDREB2A (1-208)	D2-curto -del3	<u>GGGTC</u> ATCCAGCTGGGCATTTTGCC
ZmDREB2A (1-191)	D2-curto-del4	<u>GGGTC</u> AGTGTGAGGTGGATGGAT
ZmDREB2A (1-141)	D2-curto-del5	<u>GGGTC</u> AGGGGAAGTTAGTCCGTGC
ZmDREB2A (1-253)	del1.5	<u>GGGTC</u> AGTGGATCGCTTTCCATCATCCT

5 * De cima para baixo, as sequências mostradas na tabela 3 são as de SEQ ID NOS: 25 a 31 da listagem de sequências

Tabela 4

Mutantes de remoção	Nome dos iniciadores	Sequências (5' → 3')
Iniciador A Comm	AY108198 Curto-BamHI	GGGGGATCCATGACGCTGGATCAGAA
Iniciador B,C ZmDREB2A del141-191	del-141-190-for del-141-190-rev	GCACGGACTAACCTCCCAAGCCTGAAGCCTCTGAC GTCAGAGGCTTCAGGCTTGGGGAAGTTAGTCCGTGC
ZmDREB2A del191-208	del-191-208-for del-191-208-rev	CATCGCATCCACCTCACACTCATGTGGTATCCAAGAG CTCTTGGATACCACATGAGTGTGAGGTGGATGCGGATG
ZmDREB2A del208-235	del-209-235-for del-209-235-rev	GGCAAAATGCCAGCTGGGATGGTGGTATGGTTTT AAAACCATCACCACTCCAGCTGGGCATTTTGCC
ZmDREB2A del235-272	del-236-272-for del-236-272-rev	CCTATCACAAATCTCCACTGGATTCGAGTGTCTTG CAAGACACTCGAATCCAGTGGGGGAAGTTAGTCCG
ZmDREB2A del141-235	del-141-235-for del-141-235-rev	CGGACTAACTTCCCGATGGTGGTATGGTTTT AAAACCATCACCACTCCAGCTGGGGAAGTTAGTCCG
ZmDREB2A del141-272	del-141-272-for del-141-272-rev	CGGACTAACTTCCCGCTGGATTCGAGTGTCTTG CAAGACACTCGAATCCAGGGGAAGTTAGTCCG
Iniciador D Comm	AY108198-Smal-rev	AAACCCGGGTCAGTTTAGCCGCTCC

* De cima para baixo, as sequências mostradas na tabela 4 são as de SEQ ID NOS: 32 a 45 da listagem de sequências

(4) Preparação de plasmídeo e introdução em protoplasto

DNA de plasmídeo foi produzido em massa de acordo com o método de SDS alcalino, usando o kit Plasmideo Mega ou kit Maxi de Qiagen. Um plasmídeo recombinante foi pré-cultivado em 2 ml de meio de LB, contendo antibióticos, a 37°C, por 8 horas, transferido para 500 ml de meio de LB (composição: 10 g de bacto-tripton, 5 g de extrato de bacto-levedo, 10 g de NaCl e 1,5 ml de NaOH de 1N por litro de meio), e cultivado adicionalmente durante a noite. As células cultivadas foram coletadas, suspensas em 50 ml de solução P1, e depois agitadas vigorosamente. A solução P2 (50 ml) foi adicionada, a mistura foi misturada de modo invertido, e o material resultante foi deixado em repouso à temperatura ambiente por 5 minutos. A isso foi adicionada a solução P3, a mistura foi agitada para cima e para baixo, 50 ml de solução de FWB foram adicionados, e o produto de filtração foi removido. Tampão de QBT foi adicionado ao produto de filtração, a mistura foi aplicada à coluna e DBA de plasmídeo foi extraído com ajuda do tampão de QF. O material resultante foi submetido à precipitação com isopropanol, dissolvido em uma quantidade adequada de tampão de TE e a concentração foi medida.

Células T87 que haviam sido cultivadas por 5 a 6 dias foram recuperadas (5 g), as células foram suspensas em 100 ml de uma solução de enzima (0,4 mM de MES-KOH (pH 5,6), 0,1% de Cellulase Onozuka R-10, 0,05% de Macerozyme), e a suspensão foi tratada, enquanto era agitada no escuro a 80 rpm por 2 horas, para preparar protoplastos. Os protoplastos foram lavados com Solução A (0,4 M de manitol, 0,5 mM de MES-KOH (pH 5,6), 70 mM de CaCl_2) e os protoplastos foram depois suspensos em uma solução de MaMg (0,4 M de manitol, 15 mM de MgCl_2 , 0,5 mM de MES-KOH (pH 5,6) para uma concentração de cerca de $5,0 \times 10^6$ células/ml. Depois de terem sido adicionados 10 μg de plasmídeo transmissor e plasmídeo efetuator, 100 μl de uma solução de PEG-CMS (400 mM de manitol, 100 mM de CaNO_3 , 40% de PEG) foram adicionados, a mistura foi agitada moderadamente, e o material resultante foi deixado em repouso sobre gelo por 30 minutos. O produto foi diluído com um diluente (0,4 M de manitol, 125 mM de CaCl_2 , 5 mM de KCl, 5 mM de glicose, 1,5 mM de MES-KOH (pH 5,7)) e

centrifugado para remover o material flutuante. Os protoplastos foram suspensos em meio de MS-manitol (0,4 M de manitol foram adicionados ao meio de MS, do qual tinha sido removida a sacarina), e a suspensão foi submetida à cultura estacionária a 22°C, no escuro, por 20 horas.

5 O construto efetuator usado na experiência foi preparado ligando cDNA contendo ZmDREB2A de comprimento total e uma mutação de remoção, o promotor CaMV35S, e a sequência TMV Ω . O construto transmissor foi preparado ligando um alinhamento de 3 fragmentos de 75 bp (DRE x 3), contendo DRE do promotor rd29A, o promotor mínimo TATA e a sequência GUS. O
10 plasmídio de padrão interno foi preparado ligando o promotor CaMV35S e o gene de luciferase. Os plasmídios efetuator, transmissor e de padrão interno foram introduzidos nos protoplastos pelo método de PEG.

(5) Análise da atividade de luciferase

Protoplastos foram recuperados por centrifugação a 500 rpm, à
15 temperatura ambiente, por 5 minutos, os protoplastos recuperados foram suspensos em 150 μ l de tampão triturador (50 mM de tampão de fosfato de sódio, 1 mM de EDTA, 0,1% de Triton X-100, 10 mM de β -mercaptoetanol), a suspensão foi triturada usando um homogeneizador, o produto foi centrifugado a 15.000 rpm a 4°C por 10 minutos, para remover frações insolúveis, e
20 o material resultante foi designado como um extrato celular. A atividade de luciferase foi analisada usando um kit de análise de luciferase Pickagene (Toyo Ink) de acordo com as instruções do fabricante. O extrato celular (10 μ l) foi deixado reagir com 50 μ l de solução de Pickagene, e a atividade foi analisada usando um luminômetro.

25 (6) Análise da atividade de GUS

Uma solução de substrato (100 μ l, uma mistura de um tampão triturador e 2,5 mM de 4-MUG (4-metilumbiliferil β -D-glicuronida)) foi misturada com 10 μ l do extrato celular, a mistura foi deixada reagir a 37°C por 1 hora e o produto foi adicionado a 1 ml de terminador de reação (2M Na₂CO₃), para
30 terminar a reação. A solução resultante (100 μ l) foi usada para a análise.

2. Resultados

cDNA de forma longa, de comprimento total, cDNA de forma cur-

ta, de comprimento total, uma região de ORF deduzida, extraída do cDNA de forma longa, e uma região de ORF deduzida, extraída do cDNA de forma curta, foram submetidos a uma análise de atividade. ORF do cDNA de forma longa foi preparado com referência à parte da sequência registrada no banco de dados (figura 1B, partindo de metionina como aminoácido 72). A ativação da transcrição de GUS não foi observada, substancialmente, tanto no cDNA de forma longa, de comprimento total, como no ORF do cDNA de forma longa (figura 5A). Em contraste, a atividade de GUS/LUC foi elevada 40 a 100 vezes em células, nas quais cDNA de forma curta foi introduzido. O nível de atividade era cerca de duas vezes o de DREB2A de *Arabidopsis thaliana* (forma ativa). Na experiência usando cDNA que compreendia uma mutação de remoção adicionada ao mesmo, o nível de atividade fica consideravelmente baixo, com a remoção de uma região do terminal C do aminoácido 272 (doravante, referido como "272aa"). Além disso, com a remoção de uma região até 236aa, não foi observada, substancialmente, nenhuma atividade (figura 5B). A remoção da região de 235aa a 272aa, isto é, a região interna de uma proteína de ZmDREB2A, resulta em um nível de atividade extremamente baixo. Desse modo, considera-se que um domínio para ativar a transcrição de ZmDREB2A está presente entre a região entre 235aa e o terminal C.

3. Exame

No sistema de expressão transitória, que usa protoplastos de células t87, foi observado um alto nível de ativação de transcrição indutível por ZmDREB2A. Isso indica que ZmDREB2A liga-se a DRE e funciona como um ativador de transcrição. Substancialmente não foi observada, nenhuma atividade no cDNA de forma longa; mas, verificou-se que o cDNA de forma curta tem uma capacidade muito alta de ativação de transcrição (figura 5A). No caso do cDNA de forma longa, uma sequência de 53 nucleotídeos, que está presente no centro de uma sequência, e deduzida como sendo um íntron, está ausente no cDNA de forma curta, e causa uma mudança de estrutura. Um códon de parada está inserido na sequência. Isso possibilita a codificação de uma proteína ativa. cDNA de forma longa está registrado como

EST no banco de dados, e metionina como 72aa é indicada como um códon de iniciação. No entanto, quando um ORF desse cDNA de forma longa é usado como um efetuator, não foi observada nenhuma ativação de transcrição.

5 Quando cDNA de comprimento total foi usado como efetuator, DREB2A de *Arabidopsis thaliana* apresentou baixa capacidade de ativação de transcrição; mas, ele apresentou uma alta atividade, após a remoção de uma região constituída de 30 aminoácidos a jusante de um domínio de ligação de DNA (Sakuma et al., não publicado). Pelo contrário, ZmDREB2A a-
10 apresentou uma alta capacidade de ativação de transcrição em cDNA de comprimento total, e os níveis de atividade não mudaram significativamente, mesmo quando uma região interna (141aa a 208aa) foi removida (figura 5B). Sabe-se que uma grande quantidade de aminoácidos ácidos está presente no terminal C e que uma grande quantidade de aminoácidos ácidos está
15 presente nos domínios ativadores de transcrição. Como a atividade de transcrição é significativamente diminuída quando da remoção da região de 236aa-272aa no terminal C, deduz-se que um domínio ativador de transcrição está presente na vizinhança do mesmo. Como resultado da busca de sequências em torno da região de 236aa-272aa no banco de dados, foram
20 encontradas sequências altamente homólogas em proteínas homólogas de trigo HvDRF1, arroz OsDREB2B e milheto perlífero DREB2A (figura 6). Como uma região apresentando uma atividade mais alta do que o cDNA de comprimento total não foi observado quando da remoção, deduziu-se que uma região equivalente a um domínio negativo de DREB2A não estava pre-
25 sente.

Não foram encontradas quaisquer diferenças óbvias entre o fenótipo de uma planta na qual DREB2A de *Arabidopsis thaliana* foi introduzido e o de uma planta do tipo silvestre, e essa planta transgênica não é tolerante a estresse ambiental. Desse modo, a proteína DREB2A foi considerada co-
30 mo sendo inativa apenas com a síntese. Isso é porque DREB2A compreende um domínio rico em serina(Ser)/treonina (Thr) e fosforilação desse domínio pode ser necessária para ativação (Liu et al., 1998). Também, DREB2A

torna-se ativo quando uma região de 135aa-165aa de DREB2A é removida (Sakuma et al., não publicado). A sequência de aminoácido de ZmDREB2A compreende um domínio que é rico em Ser/Thr de 99aa a 118 aa. ZmDREB2A está sempre ativo, devido à presença de um mecanismo confor-

5 macional, pelo qual o domínio acima mencionado tem probabilidade de ser fosforilado.

Uma sequência de PEST está presente em uma região de 135aa-165aa de DREB2A. Essa sequência refere-se a uma sequência de 10 bp ou mais longa, partilhada por aminoácidos básicos e é rica em prolina (P),

10 ácido glutâmico (E), serina (S), treonina (T) e ácido aspártico (D). Esse domínio está contido em muitas proteínas de vida curta, reconhecido pelas enzimas e decomposto. A presença da sequência de PEST em DREB2A e em ZmDREB2A foi inspecionada por meio de análise de busca de PEST WWW em EMBNet AUSTRIA

15 (<http://www.at.embnet.org/embnet/tools/bio/PESTfind>). Não foi descoberta nenhuma sequência candidata resultante para ZmDREB2A. Isso indica que ZmDREB2A é decomposto pela sequência de PEST e, desse modo, geralmente não apresenta atividade. Também foi informado que OsDREB2A não apresenta atividade de transcrição (Dubouzet et al., *The Plant Journal*, 33,

20 751-763). Esse OsDREB2A também foi inspecionado com relação à presença da sequência de PEST e não havia domínio equivalente para a mesma. Desse modo, é improvável que essa sequência seja a única razão para inativação.

[Exemplo 4] Análise da função de ZmDREB2A usando um transformante (1)

25 A fim de inspecionar precisamente as funções de ZmDREB2A em plantas, ZmDREB2A foi introduzido em *Arabidopsis thaliana* para preparar *Arabidopsis thaliana* transgênica, e a tolerância a estresses por baixa temperatura e desidratação de um gene de alvo ou de uma planta transgênica foi analisada.

30 1. Material e método

(1) Planta de amostra e condições de crescimento

ZmDREB2A de comprimento total foi introduzido em plantas pa-

ra produzir plantas transgênicas. Sementes desidratadas foram embebidas com uma solução de 1% de NaClO e 0,02% de Triton X-100 por 10 minutos, para esterilização. As sementes esterilizadas foram semeadas em meio de ágar GMK, submetidas a um tratamento de baixa temperatura a 4°C por 2 dias, e depois cultivadas a 22°C com um fotoperíodo de 16 horas por 14 dias. Plantas (4 plantas) foram recuperadas e o nível de expressão de Zm-DREB2A nas mesmas foi analisado. Além disso, as plantas restantes foram transferidas para vasos, deixadas crescer por 1 semana; e depois submetidas a testes de tolerância a estresses ou similar. Foram usados vasos de plantas redondos contendo solo profissional (Kakiuchi).

(2) Meio de crescimento

As composições do meio das plantas são tais como mostradas abaixo.

- Meio de ágar GMK: sal de Murashige-Skoog (Wako Pure Chemicals), 0,4 g/l de Tiaina-HCl, 0,1 g/l de mioinositol, 3% (w/v) de sacarina, 1 nM de ácido acético de indol, 10 mM de 6-benzil amino purina, 0,83% de bacto-ágar e 30 mg/l de canamicina

- meio de ágar de GMKV: meio de ágar de GMK, 100 mg/l de vancomicina

(3) Preparação de *Arabidopsis thaliana* Transgênica

Arabidopsis thaliana foi transformada usando pGreen E12 35S Ω -zm forma curta, usada na experiência que envolve o uso de protoplastos. Plasmídios (1 μ l, cerca de 70 μ g foram misturados com 40 μ l de células competentes para eletroporação (*Agrobacterium* GV3101, nas quais foi previamente introduzido o plasmídio adjuvante pSoup), o material resultante foi introduzido em uma cubeta que foi refrigerada para 4°C, e a eletroporação foi realizada a 200 Ω , 25 μ F e 2,5 kV. Meio de SOC (1 ml, 20 g de bacto-triptona, 5 g de extrato de bacto-levedo, 0,5 g de NaCl, 0,02M glicose, 0,01M MgSO₄, 0,01M MgCl₂) foi adicionado, a cultura foi conduzida a 28°C por 1 hora e a cultura foi conduzida adicionalmente em meio de-ágar LB, contendo canamicina por 2 dias, para selecionar variedades tolerantes.

Arabidopsis thaliana foi infectada com *Agrobacterium* transgêni-

ca de acordo com uma técnica convencional. Sementes obtidas da *Arabidopsis thaliana* infectada foram semeadas em meio de GMKV e plantas tolerantes a canamicina cultivadas foram selecionadas. As plantas selecionadas foram transferidas para um meio de GMKV fresco e transplantadas no solo quando tinham crescido adequadamente.

(4) Análise Northern e análise de RT-PCR quantitativa

Análise Northern e análise de RT-PCR quantitativa foram realizadas de acordo com o exemplo 2, exceto que a quantidade de RNA usada era de 5 µg.

10 (5) Aplicação de estresse

A fim de inspecionar os níveis de expressão de ZmDREB2A e do gene rd29A indutível por estresse, influenciados por estresse por baixa temperatura e desidratação, 4 linhas de células, nas quais ZmDREB2A tinha sido introduzido, uma linha de células, na qual DREB1A e DREB2A (um tipo silvestre e uma forma ativa) tinham sido introduzidos, e uma linha de células, na qual o controle do vetor pB1121 tinha sido introduzido, foram submetidas à aplicação de estresses por baixa temperatura, desidratação e sal. A estresse por baixa temperatura foi aplicada deixando a placa repousar a 4°C por 5 horas. A estresse por desidratação foi aplicada arrancando *Arabidopsis* 15 *thaliana* do meio, sem deixar meio sobre a raiz, colocando a mesma na placa e tratando a mesma em uma bancada limpa por 5 horas. A estresse por sal foi aplicada arrancando *Arabidopsis thaliana* do meio, sem deixar meio sobre a raiz, e embebendo a mesma em 250 mM de solução de NaCl.

20 (6) Teste de tolerância a estresse

25 Tolerância a estresse por congelamento foi avaliada cultivando plantas em meio de GMK por 21 dias, transferindo as plantas para vasos com solo, cultivando as plantas por 1 semana, transferindo as plantas para uma incubadora a -6°C, para tratar as plantas por 30 horas, e cultivando as plantas por 1 semana, seguido de avaliação.

30 Estresse por desidratação foi aplicada semeando plantas sobre meio, cultivando as plantas por 21 dias, transferindo as plantas para vasos com solo, cultivando as plantas por 1 semana, cessar a irrigação, e depois,

irrigar novamente cerca de 10 dias depois. As condições de recuperação das plantas, depois disso, foram observadas para avaliar a tolerância.

(7) Análise de gene indutível usando microdisposição

Uma experiência foi realizada usando o kit de microdisposição de DNA de Arabidopsis 2 oligo (21,500 genes detectados, Agilent). Os reagentes e aparelhos usados na experiência foram os da Agilent, a não ser quando especificado de outro modo.

Do mesmo modo como no exemplo 2, RNA foi extraído por meio do método de Trizol (Invitrogen). Quatro plantas foram usadas por amostra. O RNA extraído foi inspecionado usando o Bioanalyzer, para confirmar que os grupos de rRNA estavam bem definidos e que os índices de rRNA estavam de acordo com índices teóricos.

RNA total (800 ng) foi usado para cada amostra, 400 ng dos quais foram marcados com Cy3, e os outros 400 ng foram marcados com Cy5. Os iniciadores do promotor de T7 foram adicionados ao mesmo, e os produtos foram submetidos à desnaturação térmica, a 65°C por 10 minutos, seguida de resfriamento em gelo por 5 minutos. A mistura principal de síntese de cDNA (2,0 µl de 5x tampão First Strand, 1,0 µl de 0,1M DTT, 0,5 µl de mistura de 10 mM dNTP, 0,5 µl de MMLV-RT e 0,25 µl de RNaseOUT) foi adicionada e o material resultante foi tratado a 40°C por 2 horas. Depois, o produto de reação foi tratado a 65°C por 15 minutos, e a reação foi terminada, seguida de resfriamento em gelo por 5 minutos. Às soluções de reação foram adicionados 1,2 µl de 10mM de cianina 3-CTP (trifosfato de citosina) e 1,2 µl de 10 mM de cianina 5-CTP, a isso foi adicionada a mistura de transcrição (7,65 µl de água livre de nuclease, 10,0 µl de 4x tampão de transcrição, 3,0 µl de 0,1M DTT, 4,0 µl de mistura de NTP, 3,2 µl de 50% de PEG (preaquecido, 40°C), 0,25 µl de RNaseOUT, 0,3 µl de pirofosfatase inorgânica, e 0,4 µl de polimerase de RNA de T7), e as misturas foram agitadas vigorosamente para continuar a reação sob condições sombreadas a 40°C por 120 minutos. Ao produto foram adicionados 60 µl de água livre de nuclease, 350 µl de tampão de RLT e 250 µl de EtOH e misturados usando uma pipeta. A solução resultante foi transferida para uma minicoluna RNeasy (Qia-

gen), equipada com um tubo coletor de 2 ml e depois centrifugada a 13.000 rpm por 30 segundos. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor, ao mesmo foram adicionados 500- μ l de tampão de RPR, e a centrifugação foi realizada a 13.000 rpm por 30 segundos. Esse procedimento foi repetido
5 uma vez, a coluna foi transferida para um tubo coletor de 1,5 ml, ao mesmo foram adicionados 30 μ l de água livre de RNase, o tubo foi deixado em repouso por 1 minuto, e a centrifugação foi realizada a 13.000 rpm por 30 segundos, para recuperar cRNA. Esse procedimento foi realizado novamente, e a absorveção a 260 nm foi analisada, para determinar a concentração.

10 A solução de alvo de cRNA (1 μ g de cRNA marcado com Cy3, 1 μ g de cRNA marcado com Cy5, 50 μ l de 10x alvo de controle, e até 250 μ l de água livre de nuclease) foi preparada, 10 μ l de tampão de fragmentação de 25x foi adicionado à mesma, e a mistura foi vigorosamente agitada para fragmentar o alvo. A solução foi tratada sob condições sombreadas a 60°C
15 por 30 minutos. Tampão de hibridização de 2x (250 μ l) foi adicionado à mesma, a mistura foi agitada sem formação de espuma, e o material resultante foi transferido para lâminas de microdisposição. Depois, a hibridização foi realizada a 60°C por 17 horas. Depois da hibridização, as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem 1 (6x de SSC, 0,005% de Triton X-102), à
20 temperatura ambiente, por 10 minutos. Subsequentemente, as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem 2 (0,1x de SSC, 0,005% de Triton X-102) a 4°C, por 5 minutos. As lâminas lavadas foram secadas por gás de nitrogênio com ajuda de uma pistola de ar de filtração. No final, as lâminas foram colocadas sobre o suporte de lâminas do scanner de microdisposição
25 Agilent para escaneamento, e digitalização de pontos e análise de dados foram realizadas.

2. Resultados

(1) Análise de características de *Arabidopsis thaliana* transgênica de Zm-DREB2A e expressão do gene introduzido

30 51 linhas transgênicas de ZmDREB2A foram obtidas, e 32 linhas das mesmas, que forneceram sementes de T1 em quantidades suficientes para análises subsequentes, foram submetidas a RT-PCR quantitativo para

analisar os níveis de expressão dos genes introduzidos. Resultados parciais são mostrados na figura 7. As plantas foram cultivadas em meio de ágar de GMK e as condições das mesmas foram observadas 21 dias depois da semeadura (fila do alto, figura 8A). Comparadas com linhas de controle, verificou-se que as plantas com superexpressão tinham probabilidade de ter seu desenvolvimento tolhido. As plantas foram cultivadas em meio de GMK por 2 semanas e depois transferidas para o solo, e as condições das mesmas foram observadas. A figura 8 mostra as plantas no dia 35 (i.e, 21 dias depois do transplante). Tal como o caso que envolve o uso de uma placa de ágar, essas plantas mostraram retardamento de crescimento. O gene de alvo que é controlado por ZmDREB2A em *Arabidopsis thaliana* é desconhecido; mas, a expressão foi induzida por ZmDREB2A de um gene transmissor ligado a uma posição a jusante de uma sequência de DRE de um promotor de rd29A no exemplo 3. Consequentemente, deduz-se que os níveis de expressão do gene de rd29A seriam elevados na superexpressão de ZmDREB2A em *Arabidopsis thaliana*. A figura 8B mostra os resultados da análise Northern dos genes introduzidos e dos genes de rd29A em *Arabidopsis thaliana* que superexpressa ZmDREB2A. Quatro linhas transgênicas, nas quais os níveis de expressão dos genes introduzidos e dos genes de rd29A eram altas e foram observadas mudanças nas características (isto é, R6, R14, R21 e R25), foram submetidos a análises subsequentes.

(2) Avaliação da tolerância a estresses de *Arabidopsis thaliana* transgênica de ZmDREB2A

As quatro linhas de *Arabidopsis thaliana* transgênica selecionadas acima foram avaliadas em termos de tolerância quando da aplicação de estresse por congelamento e desidratação. Uma linha introduzida por vetor (controle de pBI121) foi designada como uma linha de controle. A tolerância à congelamento foi testada duas vezes, e a tolerância à desidratação foi testada 4 vezes. Quando estresse por congelamento foi aplicada, 10 entre as 25 plantas R14 sobreviveram; mas, todas as outras plantas transgênicas morreram (figura 9A). A estresse por desidratação foi aplicada transferindo as plantas no dia 21 a vasos de terra, cultivando as plantas sob condições ge-

rais por 1 semana, e cessando a irrigação por 10 dias. Depois disso, as características foram observadas por 1 a 2 semanas, para avaliar a tolerância. R6 apresentou um aperfeiçoamento especial em tolerância. As outras 3 linhas apresentaram tolerância relativamente alta, em comparação com as plantas de controle (figura 9B). Desse modo, *Arabidopsis thaliana* que superexpressa ZmDREB2A apresentou tolerância à desidratação; mas, substancialmente, não apresentou nenhum aperfeiçoamento na tolerância à estresse por congelamento.

(3) Análise do gene de alvo usando microarranjos

10 A fim de identificar genes com níveis de expressão que variam com a superexpressão de ZmDREB2A, uma ampla análise de expressão foi realizada usando um kit de microdisposição de DNA de *Arabidopsis* 2 oligo da Agilent (tabela 5). A análise de microdisposição envolveu o uso das linhas R6 e R14. A linha R6 apresenta uma expressão mais forte de genes introduzidos. Essas linhas foram submetidas duas vezes à experimentação, e os coeficientes de correlação das duas experimentações foram muito altos. Os números de genes que apresentam níveis de expressão que eram 5 vezes ou mais altos do que os dos controles em uma das experimentações foi de 88. Esses genes foram classificados em termos de funções, e 11 genes eram genes relacionados à proteína LEA, 7 genes eram genes relacionados à proteína de choque térmico, 5 genes eram genes relacionados à estresse oxidativa, 7 genes eram genes relacionados à oleosina, 5 genes eram genes relacionados ao metabolismo de açúcar, 2 genes eram genes relacionados ao transporte de membrana e 6 genes eram genes relacionados à germinação.

15

20

25

Tabela 5: Genes com níveis de expressão que foram aumentados, conforme constatado por meio de análise de microdisposição em plantas que superexpressam ZmDREB2A

Função do gene	Nº de inscrição	Índice		Indução		
		R6	R14	DRE	DREB2A	Estresse
Proteína de LEA						
proteína M10 abundante de embriogênese tardia	AT2G41280	5,9	6,9	-	-	-
semelhante a proteína abundante de embriogênese tardia	AT3G53040	21,0	25,0	1	-	-
proteína abundante de embriogênese tardia (AtECP63)	AT2G36640	15,9	23,7	-	-	-
proteína abundante de embriogênese tardia semelhante a LEA	AT5G06760	7,2	9,7	1	-	D
proteína abundante de embriogênese tardia, putativa	AT1G52690	19,5	25,8	1	23,2	N, D
proteína abundante de embriogênese tardia, putativa	AT1G32560	5,9	8,5	1	-	N
proteína de 65 KD, induzida por baixa temperatura	AT5G52300	4,9	5,6	1	6,1	N
proteína 78, induzida por baixa temperatura (rd29A)	AT5G52310	5,4	4,6	3	11,9	N, D, C
homólogo de LEA tipo 2	AT3G15670	16,8	21,4	3	-	N
similar a proteínas abundantes de embriogênese tardia	AT2G35300	7,6	9,6	-	-	-
similar a proteínas abundantes de embriogênese tardia	AT2G23110	8,2	7,9	-	-	-

Tabela 5: -continuação-

Função do gene	N° de inscrição	Índice		DRE	Indução		
		R6	R14		DREB2A	Estresse	
Choque térmico							
proteína de choque térmico 22.0	AT4G10250	8,4	5,2	-	6,1	H	
proteína de choque térmico 70	AT3G12580	10,2	4,3	1	9,1	N, H	
Proteína semelhante a fator de transcrição de choque térmico	AT5G03720	17,6	10,5	2	41,2	N, H	
proteína de choque térmico de 17, kDa (AA1-156)	AT1G53540	6,7	4,2	1	6,1	H	
proteína de choque térmico de 70 kD	AT2G32120	6,7	4,4	1	3,6	H	
AtHSP23,6-mito	AT4G25200	13,0	12,7	-	-	H	
HSP pequeno localizado em cloroplasto, putativo	AT1G52560	18,6	18,1	*	14,0	H	
detoxificação							
transferase de glutadiona, putativa	AT2G29460	6,7	4,7	1	-	-	
peroxidase, putativa	AT1G49570	19,6	7,5	-	5,4	-	
peroxidase, putativa	AT5G19890	15,7	4,8	-	5,9	-	
peroxidoxina	AT1G48130	7,1	8,1	-	-	-	
peroxidase de ascorbato (APX)	AT3G09640	9,3	6,8	*	8	H	

Tabela 5: -continuação-

Função do gene	N° de inscrição	Índice			Indução	
		R6	R14	DRE	DREB2A	Estresse
localização do corpo oleoso						
oleosina	AT5G40420	26,9	25,0	-	-	-
oleosina	AT3G01570	8,9	16,2	-	-	-
oleosina	AT3G27660	18,0	13,6	-	10,3	-
oleosina	AT2G25890	8,2	11,1	-	-	-
oleosina	AT4G25140	5,8	7,3	-	-	-
proteína específica de embrião 1, semelhante a desidrogenase de 11-beta-hidroxiesteróide (ATS1)	AT5G50600	4,8	7,9	-	-	-
oleosina	AT5G55240	4,0	7,3	1	-	-
Metabolismo de glicose						
família da transferase de glicosila	AT4G27560	6,9	4,4	3	19,0	C
transportador de monossacarídeo, putativo	AT1G34580	8,8	6,4	3	4,1	-
sintase de galactinol putativa	AT1G09350	22,4	13,7	3	27,8	C
aciltransferase de glicose putativa	AT3G10450	9,4	5,7	*	9,8	-
sintase de monogalactosildiacilglicerol putativa	AT2G11810	14,0	3,7	*	-	-

Tabela 5: -continuação-

Função do gene	Nº de inscrição	Índice		DRE	Indução	
		R6	R14		DREB2A	Estresse
tráfego de membrana						
transportador de peptídeo putativo	AT1G69870	6,1	4,4	1	11,8	N, C
canal de íons regulado por nucleotídeo cíclico	AT1G01340	5,5	4,2	*	5,3	-
maturação de semente						
proteína semelhante a germina	AT5G39150	7,8	8,6	*	6,2	-
proteína semelhante a germina	AT5G39180	6,4	6,7	*	4,7	-
proteína de maturação de semente putativa	AT2G42560	15,1	19,8	2	-	-
patogênese						
precursor da proteína 1 relacionada a patogênese, 19,3K	AT4G33720	4,9	7,0	-	21,6	-

Tabela 5: -continuação-

Função do gene	N° de inscrição	Índice		DRE	Indução	
		R6	R14		DREB2A	Estresse
outras funções						
gene regulado por ABA (ATEM6)	AT2G40170	11,0	18,1	-	-	-
proteína de ligação do elemento sensível a ABA, putativa	AT2G36270	5,4	7,2	-	-	-
fosfatase ácida tipo 5	AT3G17790	10,9	4,4	-	1,9	N
AIG1	AT1G33960	6,2	4,7	-	-	-
proteína semelhante a AtHAVA22b	AT5G62490	5,9	5,9	-	-	-
proteína semelhante à proteína BCS1	AT3G50940	9,9	4,9	1	7,2	-
deidrogenase de álcool de cinamila ELI3-2	AT4G37990	44,3	50,6	2	4,7	N
proteínase de cisteína	AT4G36880	27,1	19,5	1	10,8	-
proteínase de cisteína	AT3G54940	6,3	8,6	-	-	-
família do citocromo p450	AT4G13290	7,0	5,7	*	-	-
proteína expressada	AT3G02480	47,9	44,5	2	12,4	N, D
proteína expressada	AT3G02040	21,6	6,5	-	-	-
proteína expressada	AT1G05340	6,5	5,9	1	6,5	N
proteína expressada	AT1G75750	8,3	4,4	2	5,5	H

Tabela 5: -continuação-

Função do gene	N° de inscrição	Índice			Indução	
		R6	R14	DRE	DREB2A	Estresse
outras funções						
proteína expressada	AT2G21180	6,1	4,1	2	9,3	-
proteína expressada	AT2G32190	5,0	4,0	-	5	-
proteína hipotética	AT1G17710	36,7	16,1		3,5	-
proteína hipotética	AT1G05510	5,1	10,3	-	-	-
proteína hipotética	AT1G23070	6,1	9,7	*	-	-
proteína hipotética	AT1G65090	5,6	8,6	-	-	-
proteína hipotética	AT1G73120	4,7	8,2	-	-	-
proteína hipotética	AT3G24340	12,7	6,4	*	-	-
proteína hipotética	AT1G01470	10,2	6,4	3	13,2	N, D, C
proteína semelhante a sintase de malato	AT5G03860	17,9	18,0	-	2	-
fosfolipase C, específica de fosfoinosítido, putativa	AT3G55940	10,4	6,3	*	15,4	-
proteína relacionada à dessecação putativa	AT2G46140	7,9	5,0	1	8,1	N, D
radutase de tRNA de glutamila putativa	AT2G31250	11,5	7,3	*	-	-
liase de isocitrato putativa	AT3G21720	12,3	11,5	1	-	-
proteína de transferência de lipídios, não específica, putativa	AT2G38530	11,1	6,8	2	8,8	-

Tabela 5: -continuação-

Função do gene	N° de acesso	Razão			Indução		
		R6	R14	DRE	DREB2A	Estresse	
outras funções							
proteína putativa	AT4G25580	14,9	20,6	2	-	-	N
proteína putativa	AT4G21020	18,2	20,4	2	13,5	-	-
proteína putativa	AT5G01300	9,5	14,5	-	-	-	-
proteína putativa	AT5G20790	21,2	9,7	*	2,8	-	-
proteína putativa	AT5G23220	15,4	8,4	1	7,9	-	-
proteína putativa	AT4G25850	7,4	8,4	2	-	-	-
proteína putativa	AT4G39130	4,7	6,1	*	-	-	-
proteína putativa	AT5G64080	9,6	6,0	1	6	-	-
proteína putativa	AT4G34300	6,8	5,1	*	-	-	-
ribonuclease, RNS1	AT2G02990	9,2	4,2	1	-	-	-
carboxipeptidase de serina II, putativa	AT1G43780	9,5	6,7	*	-	-	-
carboxipeptidase de serina II, putativa	AT1G33540	19,7	8,7	*	16,8	-	-
proteína desconhecida	AT3G17520	36,9	41,6	-	16,8	N,D	-
proteína desconhecida	AT1G08310	13,0	6,0	*	-	-	-
proteína desconhecida	AT1G23110	17,3	5,6	*	-	-	-

Razões: Foram determinadas as intensidades de sinal de plantas do tipo silvestre, normalizadas, e plantas com superexpressão, normalizadas, foi calculada a média de dois valores de hibridização e foi calculada a média dos valores resultantes.

- 5 DRE: O banco de dados do cDNA de comprimento total de *Arabidopsis thaliana* (Riken) foi usado para referência. "DRE" representa o número de uma sequência de DRE (ACCGAC), que está presente dentro de 1.000 nucleotídeos a montante do ponto de iniciação de transcrição.

*: Genes com cDNA de comprimento total não estão registrados em RARGE.

- 10 DREB2A: Genes com níveis de expressão que são aumentados (pelo menos 3 vezes) quando DREB2A modificado é aplicado ao arranjo. Valores numéricos indicam os índices atingidos nesse momento.

Estresse: Genes com níveis de expressão que aumentaram pelo menos 3 vezes quando da aplicação de estresse (N: 250 mM de NaCl por 10 horas;

- 15 D: desidratação por 10 horas; C: 4°C por 10 horas; H: alta temperatura por 5 horas)

3. Discussão

- Plantas que superexpressam *Arabidopsis thaliana* (32 linhas) foram deixadas crescer por 2 semanas e depois foram submetidas à inspeção dos níveis de expressão de ZmDREB2A (figura 8B). Como resultado, os níveis de expressão de ZmDREB2A encontrados eram altos em plantas que apresentavam retardamento de crescimento. Dentre essas linhas, foram selecionadas 4 linhas que apresentavam altos níveis de expressão de ZmDREB2A. A linha R6 apresentou o nível mais alto de expressão de ZmDREB2A entre as linhas selecionadas, embora a linha R6 apresentasse um índice de germinação baixo. Em comparação com plantas do tipo silvestre, essas 4 plantas transgênicas cresceram lentamente (figura 8A). Já foi informado que plantas na quais os genes do tipo DREB/CBF estavam superexpressados com o uso do promotor 35S são de crescimento lento. Mas, o que foi informado no passado era o gene do tipo DREB1, e não foram observadas diferenças de fenótipo em *Arabidopsis thaliana*, que superexpressa DREB2A ou OsDREB2A de arroz. Como o retardamento de crescimento

ocorreu aqui em genes do tipo DREB2A, considera-se que ZmDREB2A tem uma capacidade de ativar a transcrição em plantas sem modificação, diferentemente de *Arabidopsis thaliana* DREB2A ou OsDREB2A de arroz.

5 Considera-se que a expressão de funções de DREB2A exija algumas modificações pós-translacionais. Sakuma et al. prepararam DREB2A ativo e submeteram *Arabidopsis thaliana* transgênica de DREB2A ativo à análise de microdisposição (não publicada). Como resultado da análise de microdisposição de *Arabidopsis thaliana* com superexpressão de ZmDREB2A, muitos genes comuns aos genes de DREB2A a jusante e genes
10 indutíveis por NaCl foram detectados (tabela 5). Uma sequência de promotor, que compreende uma região de até 1.000 bp, a montante do ponto de iniciação da transcrição, que está descrita no banco de dados de cDNA de comprimento total de *Arabidopsis thaliana* (Riken) (<http://rarge.gsc.riken.go.jp/>), e constatou-se que 35 genes entre os genes
15 identificados contêm uma sequência de DRE. Entre esses 35 genes, verificou-se que os níveis de expressão de 24 genes de DREB2A modificados aumentaram. Acredita-se que ZmDREB2A se ligue a uma sequência de DRE e induza a expressão de um gene a jusante. Consequentemente, acredita-se que níveis de expressão aumentados de genes com essas sequên-
20 cias de promotor sejam induzidos diretamente por proteínas de ZmDREB2A. Desse modo, acredita-se que ZmDREB2A funcione de um modo similar ao de DREB2A em *Arabidopsis thaliana* E ZmDREB2A foi identificado como sendo um gene do tipo DREB2.

Exemplo 5: Análise das funções de ZmDREB2A usando transformante (2)

25 A fim de inspecionar minuciosamente as funções de ZmDREB2A em plantas, ZmDREB2A foi introduzido em *Arabidopsis thaliana* de acordo com o procedimento do exemplo 4, para preparar *Arabidopsis thaliana* transgênica, e a tolerância a estresse de alta temperatura de genes-alvo e plantas transgênicas foi analisada.

30 Materiais e métodos usados estavam basicamente de acordo com os do exemplo 4. Duas plantas de cada uma de duas linhas de *Arabidopsis thaliana*, que supreexpressam ZmDREB2A (isto é, linha 6 e linha 25)

foram usadas. Plantas criadas a partir de sementes, que foram cultivadas em meio de GM por 18 dias, foram transferidas para vasos contendo solo de cultura. Depois de as plantas terem sido cultivadas por 11 dias, as partes terrestres foram embebidas em um banho de água a 44°C por 10 minutos (isto é, aplicação de estresse por alta temperatura). As plantas foram cultivadas sob condições comuns depois disso, e as condições de crescimento foram observadas 4 dias e 7 dias mais tarde. Os resultados são mostrados na figura 10.

As plantas de controle morreram 7 dias depois da aplicação de estresse; mas, uma das plantas da linha 6 sobreviveu. Desse modo, constatou-se que ZmDREB2A contribui para a resposta à estresse por alta temperatura.

Exemplo 6: Análise das funções de ZmDREB2A usando transformante (3)

(1) Viabilidade contra carga em alta temperatura

Plantas nas quais ZmDREB2A tinha sido introduzido foram semeadas em meio de ágar de GM contendo canamicina, as plantas foram cultivadas por 6 dias e as plantas cultivadas foram transferidas para um papel de filtro embebido em 4 ml de meio de GM (em uma placa petri). Primeiramente, as plantas foram cultivadas a 22°C por 2 dias, deixas em repouso a 22°C, 44°C ou 45°C (isto é, estresse por alta temperatura) por 1 hora, e depois devolvidas a 22°C, para crescer. Como controle, *Arabidopsis thaliana*, na qual ZmDREB2A não foi introduzido (isto é, um tipo silvestre), foi deixada crescer da mesma maneira.

A figura 11 mostra que plantas que foram cultivadas em meio de GM líquido por um período adicional de 2 semanas, depois do teste, e a viabilidade das mesmas (o desvio médio e o desvio padrão ($n \geq 50$)). "WT" representa uma planta de controle, na qual ZmDREB2A não foi introduzido, e A, B e C representam, cada qual, uma planta na qual ZmDREB2A foi introduzido (3-linhas no total).

Tal como é visível da figura 11, uma planta na qual ZmDREB2A foi introduzido apresentou uma tolerância à estresse por alta temperatura significativamente mais alta do que uma planta do tipo silvestre.

(2) Análise Northern

Plantas nas quais foi introduzido ZmDREB2A foram submetidas a condições de crescimento comuns, a carta por alta-temperatura (a 37°C por 1 hora ou 5 horas), a estresse por sal (em 250 mM de solução salina por 5 horas), ou a estresse por desidratação (desidratadas por 5 horas), e expressão de genes, isto é, At5g03720 (AtHSFA3), at3g12580 (proteína de choque térmico 70), Atlg52560 (proteína de choque térmico pequena, localizada em cloroplasto), Atg25200 (AtHSP23.6-mito), At4g10250 (proteína de choque térmico 22.0) e At5g12030 (proteína de choque térmico 17.6A), com referência às expressões das quais se sabe que são induzidas, particularmente, pela estresse por alta temperatura, foi analisada por meio do método Northern. Como controle, *Arabidopsis thaliana*, na qual ZmDREB2A não foi introduzido, foi deixada crescer da mesma maneira e depois analisada.

Os resultados são mostrados na figura 12. Os níveis de expressão encontrados dos genes citados acima foram significativamente mais altos em plantas, nas quais ZmDREB2A havia sido introduzido, do que os de uma planta de controle (tipo silvestre).

Exemplo 7: Análise de funções de ZmDREB2A, usando transformante (4)

De acordo com os procedimentos dos exemplos 3 e 4, ZmDREB2A foi ligado ao promotor de rd29A, isto é, um promotor indutível por estresse, para preparar plantas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas (3 linhas) e a tolerância a estresse por desidratação e baixa temperatura das mesmas foi analisada. Como controle, *Arabidopsis thaliana*, na qual ZmDREB2A não foi introduzido (isto é, do tipo silvestre), foi deixada crescer da mesma maneira e depois analisada.

Os resultados são mostrados na figura 13. Em plantas de *Arabidopsis thaliana*, nas quais ZmDREB2A é superexpressado constantemente com a ajuda do promotor de 35S, foi observada uma forte inibição de crescimento (figura 8A). Em plantas, nas quais o nível de expressão de ZmDREB2A é alto, sob o controle do promotor de rd29A, porém, não foi observado qualquer retardamento de crescimento óbvio, comparado com uma planta do tipo silvestre (figura 13A). A acumulação de mRNA de rd29A, cuja

expressão é induzida por ZmDREB2A, foi aumentada quando da aplicação de estresse (figura 13B). Como resultado da aplicação de estresse por desidratação, por interrupção de irrigação por 10 dias, apenas 30% das plantas de *Arabidopsis thaliana* do tipo silvestre sobreviveram; mas, as três plantas de rd29A:ZmDREB2A apresentaram viabilidades de, em cada caso, 96,3%, 88,8% e 81,3% (figura 13C). Por regulação da expressão de ZmDREB2A pelo promotor de rd29A, a tolerância à estresse por desidratação foi aperfeiçoada, enquanto foi evitada a inibição de crescimento. Em contraste, o aperfeiçoamento na tolerância à estresse por congelamento não foi tão significativa como o na tolerância à estresse por desidratação (figura 13C), tal como com o caso que envolve o uso do promotor de 35S (figura 9A).

Exemplo de Referência: Tolerância à estresse por alta temperatura de *Arabidopsis thaliana* alterada (modificada), que superexpressa DREB2A

A tolerância à estresse por alta temperatura de uma planta de *Arabidopsis thaliana* ativa, que superexpressa DREB2A (DREB2A CA OX), da qual uma região que compreende os aminoácidos 136 a 165 foi removida, foi comparada com a de uma planta de controle. Como controle, foi usada uma planta de *Arabidopsis thaliana* que compreende um vetor de expressão, sem uma sequência de DREB2A introduzida no mesmo. Plantas que foram cultivadas em meio de ágar de GM por 5 dias depois da semeadura, foram transferidas para um papel de filtro umedecido com meio de GM e as plantas foram deixadas crescer por mais 2 dias. Depois de 7 dias após a semeadura, as plantas foram submetidas a um teste de tolerância a uma estresse por alta temperatura. A estresse por alta temperatura foi aplicada a 22°C, 42°C, 43°C, 44°C ou 45°C por 1 hora. Depois da aplicação de estresse por alta temperatura, a temperatura foi imediatamente retornada para temperatura ambiente, as plantas foram deixadas crescer a essa temperatura por 1 semana, e, depois, as viabilidades foram determinadas.

Quando tratadas a 42°C ou 43°C, não foi observada nenhuma diferença entre uma planta de controle e DREB2A-CA OX (figura 14). Mas, a viabilidade de uma planta de controle foi reduzida para 76%, quando tratada a 44°C, e a viabilidade a 45°C baixou para 2%. Em contraste, a viabilidade

de DREB2A CA OX não foi reduzida quando tratada a 45°C (figura 14).

De acordo com essa experiência, verificou-se que ZmDREB2A funciona em resposta a estresses ambientais, tais como estresse por desidratação ou alta temperatura. Além disso, essa experiência sugere a possibilidade do desenvolvimento de culturas tolerantes a estresses por desidratação e alta temperatura usando o gene ZmDREB2A.

Todas as publicações, patentes e pedidos de patente citados no presente, estão incorporadas ao presente por referência, em sua totalidade.

Aplicabilidade industrial

10 O uso do gene ZmDREB2A de acordo com a presente invenção pode conferir às plantas tolerância a estresses ambientais, tais como estresses por desidratação ou alta temperatura, sem modificações especiais. Consequentemente, a presente invenção é de alta utilidade na preparação de uma nova planta tolerante a estresses ambientais.

15 Texto livre de listagem de sequências

SEQ ID NO: 1: cDNA (forma curta) do gene ZmDREB2A

SEQ ID NO: 3: cDNA (forma longa) do gene ZmDREB2A

SEQ ID NOs: 5 a 45: descrição de sequências artificiais: DNAs sintéticos (iniciadores)

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

5 <110> Incorporated Administrative Agency Japan International Research Center for
 Agricultural Sciences
 <120> FATOR DE TRANSCRIÇÃO INDUZIDO POR ESTRESSE, DERIVADO DO
 MILHO
 <130> PH-2768-PCT
 10 <140>
 <141>
 <140> JP2005-270970
 15 <141> 2005-09-16
 <160> 44
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 20 <210> 1
 <211> 1283
 <212> DNA
 <213> Zea mays L
 25 <220>
 <223> ZmDREB2A cDNA (Curtot form)
 <220>
 30 <221> CDS
 <222> (89)..(1042)
 <400> 1
 35 ggtcttatcg actccaacaa gaacacacta cacaccagcc agcgagatag cgaacgctag 60
 gaacccagtg gccatctttg gagcggcc atg acg ctg gat cag aac cat gcc 112
 Met Thr Leu Asp Gln Asn His Ala
 1 5
 40 atg ccg atg cag ccc ccg gcc ctg cag ccc gga agg aag aag cga cct 160
 Met Pro Met Gln Pro Pro Ala Leu Gln Pro Gly Arg Lys Lys Arg Pro
 10 15 20
 45 cgc aga tca cga gat ggg cct acg tca gtg gca gct gtc atc cag cgg 208
 Arg Arg Ser Arg Asp Gly Pro Thr Ser Val Ala Ala Val Ile Gln Arg
 25 30 35 40
 50 tgg gct gag cgc aac aag cat ttg gag tat gag gaa tct gag gag gca 256
 Trp Ala Glu Arg Asn Lys His Leu Glu Tyr Glu Glu Ser Glu Glu Ala
 45 50 55
 aag cga cca aga aaa gca cct gca aag ggt tcg aag aag ggc tgt atg 304
 Lys Arg Pro Arg Lys Ala Pro Ala Lys Gly Ser Lys Lys Gly Cys Met
 60 65 70
 55 aag gga aaa ggg ggg cct gac aat act caa tgt gga tac cgt gga gtg 352
 Lys Gly Lys Gly Gly Pro Asp Asn Thr Gln Cys Gly Tyr Arg Gly Val
 75 80 85

agg cag cgt act tgg ggg aag tgg gtt gct gaa ata aga gag cca aat 400
 Arg Gln Arg Thr Trp Gly Lys Trp Val Ala Glu Ile Arg Glu Pro Asn
 90 95 100

5 cgt gtc gac aga ctc tgg ctg ggt acc ttc cca acc gcg gag gat gca 448
 Arg Val Asp Arg Leu Trp Leu Gly Thr Phe Pro Thr Ala Glu Asp Ala
 105 110 115 120

10 gct agg gcc tat gac gag gca gcc aga gcg atg tat gga gac ttg gca 496
 Ala Arg Ala Tyr Asp Glu Ala Ala Arg Ala Met Tyr Gly Asp Leu Ala
 125 130 135

15 cgg act aac ttc ccc gga cag gat gca aca acc tct gcc caa gct gct 544
 Arg Thr Asn Phe Pro Gly Gln Asp Ala Thr Thr Ser Ala Gln Ala Ala
 140 145 150

20 cta gca tcg acc tct gcc cag gct gct cca aca gct gtc gaa gct ctt 592
 Leu Ala Ser Thr Ser Ala Gln Ala Ala Pro Thr Ala Val Glu Ala Leu
 155 160 165

25 cag act ggc acg tca tgc gag tcg aca acg aca tca aat tac tcg gac 640
 Gln Thr Gly Thr Ser Cys Glu Ser Thr Thr Thr Ser Asn Tyr Ser Asp
 170 175 180

30 atc gca tcc acc tca cac aag cct gaa gcc tct gac atc tcg agc tcc 688
 Ile Ala Ser Thr Ser His Lys Pro Glu Ala Ser Asp Ile Ser Ser Ser
 185 190 195 200

35 cta aag gca aaa tgc cca gct gga tca tgt ggt atc caa gag ggt aca 736
 Leu Lys Ala Lys Cys Pro Ala Gly Ser Cys Gly Ile Gln Glu Gly Thr
 205 210 215

40 ccc agt gta gct gac aag gag gtc ttt ggg ccg ttg gag cct atc aca 784
 Pro Ser Val Ala Asp Lys Glu Val Phe Gly Pro Leu Glu Pro Ile Thr
 220 225 230

45 aat ctt cca gat ggt ggt gat ggt ttt gat atc ggt gag atg ctg agg 832
 Asn Leu Pro Asp Gly Gly Asp Gly Phe Asp Ile Gly Glu Met Leu Arg
 235 240 245

50 atg atg gaa agc gat cca cat aat gca ggt gga gct gac gct ggc atg 880
 Met Met Glu Ser Asp Pro His Asn Ala Gly Gly Ala Asp Ala Gly Met
 250 255 260

55 ggg cag ccc tgg tgt ctt gat gag ctg gat tcg agt gtc ttg gag agc 928
 Gly Gln Pro Trp Cys Leu Asp Glu Leu Asp Ser Ser Val Leu Glu Ser
 265 270 275 280

60 atg ctc cag cca cag cca gag cca gag cca ttc ctg atg tct gaa gaa 976
 Met Leu Gln Pro Gln Pro Glu Pro Glu Pro Phe Leu Met Ser Glu Glu
 285 290 295

65 ccg gac atg ttt ctt gct ggc ttc gaa agc gct ggt ttc gtc gag ggt 1024
 Pro Asp Met Phe Leu Ala Gly Phe Glu Ser Ala Gly Phe Val Glu Gly
 300 305 310

ctg gag cgg cta aac tga atttctgatg tttgaccggt gatcctcatc 1072
 Leu Glu Arg Leu Asn
 315

60 ccacttcatg tctgagcttg tgaattcgga ggcaaacatt ggcagaactt ataagctcta 1132
 gcaattctag gcttttatat tcctctgtaa atagttctct agtcatggga actgggtttg 1192

65 cttcacattt tttgtaagac cagaagtgat gtaaatagtt cccaccttgt ggaaggacaa 1252
 gaaaaaata aataaaaaga gtgcttgctt t 1283

<210> 2
 <211> 317
 5 <212> PRT
 <213> Zea mays L

<220>
 10 <223> ZmDREB2A cDNA (Curto t form)

<400> 2
 Met Thr Leu Asp Gln Asn His Ala Met Pro Met Gln Pro Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 Gln Pro Gly Arg Lys Lys Arg Pro Arg Arg Ser Arg Asp Gly Pro Thr
 15 20 25 30
 Ser Val Ala Ala Val Ile Gln Arg Trp Ala Glu Arg Asn Lys His Leu
 35 40 45
 Glu Tyr Glu Glu Ser Glu Glu Ala Lys Arg Pro Arg Lys Ala Pro Ala
 50 55 60
 20 Lys Gly Ser Lys Lys Gly Cys Met Lys Gly Lys Gly Gly Pro Asp Asn
 65 70 75 80
 Thr Gln Cys Gly Tyr Arg Gly Val Arg Gln Arg Thr Trp Gly Lys Trp
 85 90 95
 Val Ala Glu Ile Arg Glu Pro Asn Arg Val Asp Arg Leu Trp Leu Gly
 100 105 110
 25 Thr Phe Pro Thr Ala Glu Asp Ala Ala Arg Ala Tyr Asp Glu Ala Ala
 115 120 125
 Arg Ala Met Tyr Gly Asp Leu Ala Arg Thr Asn Phe Pro Gly Gln Asp
 130 135 140
 30 Ala Thr Thr Ser Ala Gln Ala Ala Leu Ala Ser Thr Ser Ala Gln Ala
 145 150 155 160
 Ala Pro Thr Ala Val Glu Ala Leu Gln Thr Gly Thr Ser Cys Glu Ser
 165 170 175
 35 Thr Thr Thr Ser Asn Tyr Ser Asp Ile Ala Ser Thr Ser His Lys Pro
 180 185 190
 Glu Ala Ser Asp Ile Ser Ser Ser Leu Lys Ala Lys Cys Pro Ala Gly
 195 200 205
 Ser Cys Gly Ile Gln Glu Gly Thr Pro Ser Val Ala Asp Lys Glu Val
 210 215 220
 40 Phe Gly Pro Leu Glu Pro Ile Thr Asn Leu Pro Asp Gly Gly Asp Gly
 225 230 235 240
 Phe Asp Ile Gly Glu Met Leu Arg Met Met Glu Ser Asp Pro His Asn
 245 250 255
 45 Ala Gly Gly Ala Asp Ala Gly Met Gly Gln Pro Trp Cys Leu Asp Glu
 260 265 270
 Leu Asp Ser Ser Val Leu Glu Ser Met Leu Gln Pro Gln Pro Glu Pro
 275 280 285
 Glu Pro Phe Leu Met Ser Glu Glu Pro Asp Met Phe Leu Ala Gly Phe
 290 295 300
 50 Glu Ser Ala Gly Phe Val Glu Gly Leu Glu Arg Leu Asn
 305 310 315

<210> 3
 55 <211> 1336
 <212> DNA
 <213> Zea mays L

<220>
 60 <223> ZmDREB2A cDNA (Longo form)

<220>

<221> CDS

<222> (89)..(358)

5 <400> 3

```

ggctttatcg actccaacaa gaacacacta cacaccagcc agcgagatag cgaacgctag 60

gaacccagtg gccatctttg gagcggcc atg acg ctg gat cag aac cat gcc 112
                               Met Thr Leu Asp Gln Asn His Ala
                               1           5

10 atg ccg atg cag ccc ccg gcc ctg cag ccc gga aga gca tat gga gca 160
    Met Pro Met Gln Pro Pro Ala Leu Gln Pro Gly Arg Ala Tyr Gly Ala
        10           15           20

15 gag ggc agt gct gtg gtg cat ggt tcc atc aga aca gta gga aga agc 208
    Glu Gly Ser Ala Val Val His Gly Ser Ile Arg Thr Val Gly Arg Ser
        25           30           35           40

20 gac ctc gca gat cac gag atg ggc cta cgt cag tgg cag ctg tca tcc 256
    Asp Leu Ala Asp His Glu Met Gly Leu Arg Gln Trp Gln Leu Ser Ser
                45           50           55

25 agc ggt ggg ctg agc gca aca agc att tgg agt atg agg aat ctg agg 304
    Ser Gly Gly Leu Ser Ala Thr Ser Ile Trp Ser Met Arg Asn Leu Arg
                60           65           70

30 agg caa agc gac caa gaa aag cac ctg caa agg gtt cga aga agg gct 352
    Arg Gln Ser Asp Gln Glu Lys His Leu Gln Arg Val Arg Arg Ala
                75           80           85

gta tga agggaaaagg ggggcctgac aatactcaat gtggataccg tggagtgagg 408
Val
    90

35 cagcgtactt gggggaagtg ggttgctgaa ataagagagc caaatcgtgt cgacagactc 468

tggctgggta ccttcccaac cgcgaggat gcagctaggg cctatgacga ggcagccaga 528

40 gcgatgtatg gagacttggc acggactaac ttccccggac aggatgcaac aacctctgcc 588

caagctgctc tagcatcgac ctctgcccag gctgctcaa cagctgtcga agctcttcag 648

actggcacgt catgcgagtc gacaacgaca tcaaattact cggacatcgc atccacctca 708

45 cacaagcctg aagcctctga catctcgagc tcctaaagg caaaatgccc agctggatca 768

tgtggtatcc aagagggtag acccagtgta gctgacaagg aggtctttgg gccgttgagg 828

50 cctatcacia atcttccaga tgggtggtgat ggttttgata tcggtgagat gctgaggatg 888

atggaagcg atccacataa tgcaggtgga gctgacgctg gcatggggca gccctggtgt 948

cttgatgagc tggattcgag tgtcttgagg agcatgctcc agccacagcc agagccagag 1008

55 ccattcctga tgtctgaaga accggacatg tttcttgctg gcttcgaaag cgctggtttc 1068

gtcgagggtc tggagcggct aaactgaatt tctgatgttt gaccgttgat cctcatccca 1128

60 cttcatgtct gagcttgga attcggaggc aaacattggc agaactata agctctagca 1188

attctaggct tttatattcc tctgtaaata gttctctagt catgggaact gggtttgctt 1248

cacatTTTTT gtaagaccag aagtgatgta aatagttccc accttggtga aggacaagaa 1308

65 aaaaataaat aaaaagagtg cttgcttt 1336

```

<210> 4
 <211> 89
 5 <212> PRT
 <213> Zea mays L

<220>
 10 <223> ZmDREB2A cDNA (Longo form)

<400> 4
 Met Thr Leu Asp Gln Asn His Ala Met Pro Met Gln Pro Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 15 Gln Pro Gly Arg Ala Tyr Gly Ala Glu Gly Ser Ala Val Val His Gly
 20 25 30
 Ser Ile Arg Thr Val Gly Arg Ser Asp Leu Ala Asp His Glu Met Gly
 35 40 45
 Leu Arg Gln Trp Gln Leu Ser Ser Gly Gly Leu Ser Ala Thr Ser
 50 55 60
 20 Ile Trp Ser Met Arg Asn Leu Arg Arg Gln Ser Asp Gln Glu Lys His
 65 70 75 80
 Leu Gln Arg Val Arg Arg Arg Ala Val
 85

REIVINDICAÇÕES

1. Gene, caracterizado pelo fato de que compreende o seguinte DNA (a) ou (b):

5 (a) DNA, que consiste na sequência de nucleotídeo, tal como mostrada em SEQ ID NO: 1; ou

(b) DNA derivado de milho, que se hibridiza sob condições constitutivas com DNA, constituído de uma sequência de nucleotídeo que é complementar ao DNA constituído da sequência de nucleotídeo, tal como mostrada na SEQ ID NO: 1 e codifica uma proteína, que ativa a transcrição de
10 um gene localizado a jusante de um elemento sensível a estresse, para aperfeiçoar a tolerância a estresse por desidratação e alta temperatura de uma planta.

2. Gene, caracterizado pelo fato de que codifica a seguinte proteína (c) ou (d):

15 (c) uma proteína, que consiste na sequência de aminoácido, tal como mostrada na SEQ ID NO: 2; ou

(d) uma proteína derivada de milho, que consiste em uma sequência de aminoácido derivada da sequência de aminoácido, tal como mostrada na SEQ ID NO: 2, por remoção, substituição ou adição de um ou mais
20 aminoácidos, e que ativa a transcrição de um gene localizado a jusante de um elemento sensível a estresse, para aperfeiçoar a tolerância a estresse por desidratação e alta temperatura de uma planta.

3. Proteína recombinante, caracterizada pelo fato de que é derivada da seguinte proteína (c) ou (d):

25 (c) uma proteína, que consiste na sequência de aminoácido, tal como mostrada em SEQ ID NO: 2; ou

(d) uma proteína derivada de milho, que consiste em uma sequência de aminoácido derivada da sequência de aminoácido, tal como mostrada em SEQ ID NO: 2, por remoção, substituição ou adição de um ou mais
30 aminoácidos, e que ativa a transcrição de um gene localizado a jusante de um elemento sensível a estresse, para aperfeiçoar a tolerância a estresse por desidratação e alta temperatura de uma planta.

4. Vetor recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende o gene, como definido na reivindicação 1 ou 2, ligado a jusante de um promotor indutível por estresse.

5 5. Vetor recombinante de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o promotor indutível por estresse é o promotor de rd29A.

6. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que é transformada com o vetor recombinante como definido na reivindicação 4 ou 5.

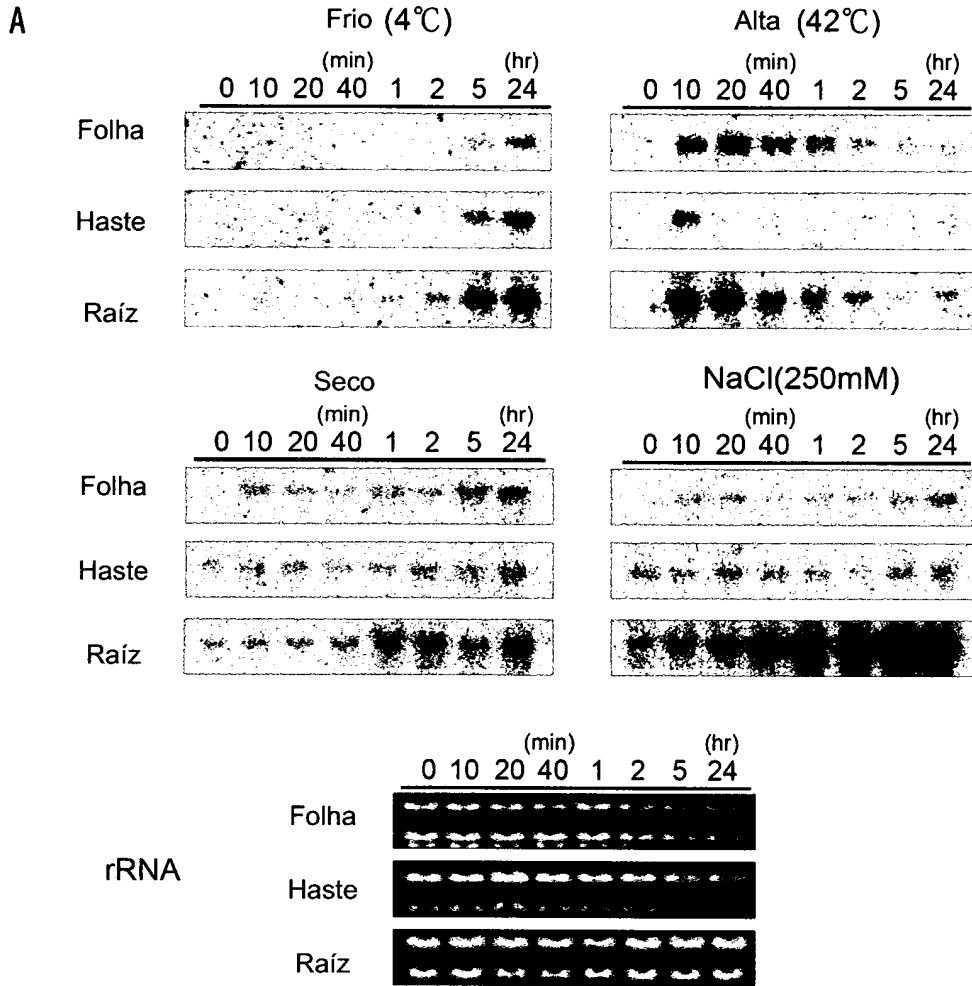
10 7. Método para preparar uma planta transgênica, com tolerância a estresse por desidratação e alta temperatura aperfeiçoada em relação à planta do tipo silvestre, caracterizado pelo fato de que compreende introduzir o vetor recombinante como definido na reivindicação 4 ou 5, em uma planta.

15 8. Método para aperfeiçoar a tolerância a estresse de uma planta, caracterizado pelo fato de que compreende introduzir o vetor recombinante como definido na reivindicação 4 ou 5, na planta.

Fig. 1A

1 GGGCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATGGTCTTATCGACTCCAACAAGA 60
 61 ACACACTACACACCAGCCAGCGAGATAGCGAACGCTAGGAACCCAGTGGCCATCTTTGGA 120
 121 CGGCCATGACCGTGGATCAGAACCATGCCATGCCGATGCAGCCCCGGCCCTGCAGCCC 180
 181 GGAAGAGCATATGGAGCAGAGGGCAGTGCCTGTGGTGCATGGTTCCATCAGAACAGTAGGA 240
 241 AGAAGCGACCTCGCAGATCACGAGATGGGCCTACGTCAGTGGCAGCTGTCATCCAGCGGT 300
 301 GGGCTGAGCGCAACAAGCATTGGAGTATGAGGAATCTGAGGAGGCAAAGCGACCAAGAA 360
 361 AAGCACCTGCAAAGGGTTCAAGAAGGGCTGTATGAAGGAAAAGGGGGCCTGACAATA 420
 421 CTCAATGTGGATACCGTGGAGTGAGGCAGCGTACTGGGGGAAGTGGTTGCTGAAATAA 480
 481 GAGAGCCAAATCGTGTCCGACAGACTCTGGCTGGGTACCTTCCCAACCCGGAGGATGCAG 540
 541 CTAGGGCCTATGACGAGGCAGCCAGAGCGATGTATGGAGACTTGGCACGGACTAACTTCC 600
 601 CCGGACAGGATGCAACAACCTCTGCCAAGCTGCTCTAGCATCGACCTCTGCCAGGCTG 660
 661 CTCCAACAGCTGTGGAAGCTCTTCAGACTGGCACGTCATCGGACTCGACAACGACATCAA 720
 721 ATTACTCGGACATCGCATCCACCTCACACAAGCCTGAAGCCTCTGACATCTCGAGCTCCC 780
 781 TAAAGGCAAAATGCCCAGCTGGATCATGTGGTATCCAAGAGGGTACACCCAGTGTAGCTG 840
 841 ACAAGGAGTCTTTGGGCCGTTGGAGCCTATCACAAATCTCCAGATGGTGGTATGGTT 900
 901 TTGATATCGGTGAGATGCTGAGGATGATGGAAAGCGATCCACATAATGCAGGTGGAGCTG 960
 961 ACGCTGGCATGGGGCAGCCCTGGTCTTTGATGAGCTGGATTGAGTGTCTTGGAGAGCA 1020
 1021 TGTCCAGCCACAGCCAGAGCCAGGCCATTCTGATGTCTGAAGAACCGGACATGTTTC 1080
 1081 TTGCTGGCTTCGAAAGCGCTGGTTTCGTCGAGGGTCTGGAGCGGCTAAACTGAATTTCTG 1140
 1141 ATGTTTGACCGTTGATCCTCATCCCACTTCATGTCTGAGCTTGTGAATTCGGAGGCAAC 1200
 1201 ATTGGCAGAACTTATAAGCTCTAGCAATTCTAGGCTTTTATATTCCTCTGTAATAGTTC 1260

Fig. 2



B

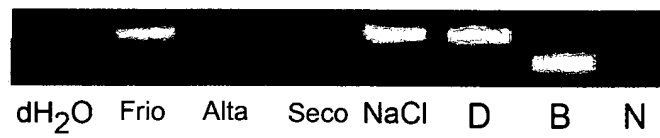
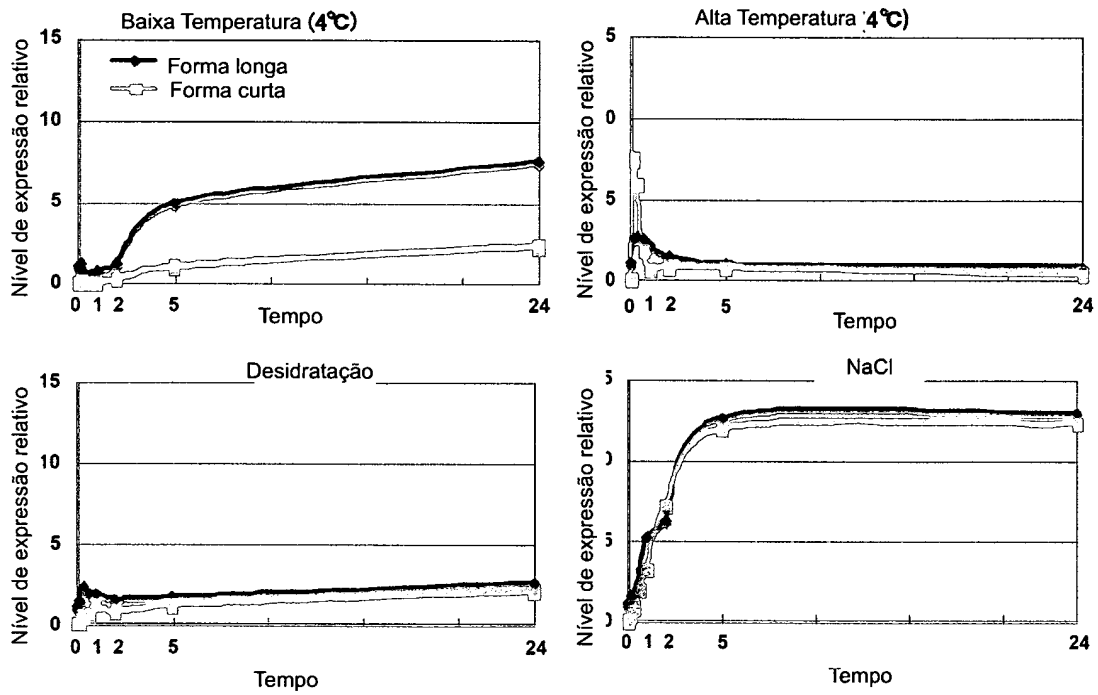


Fig. 3

A



B

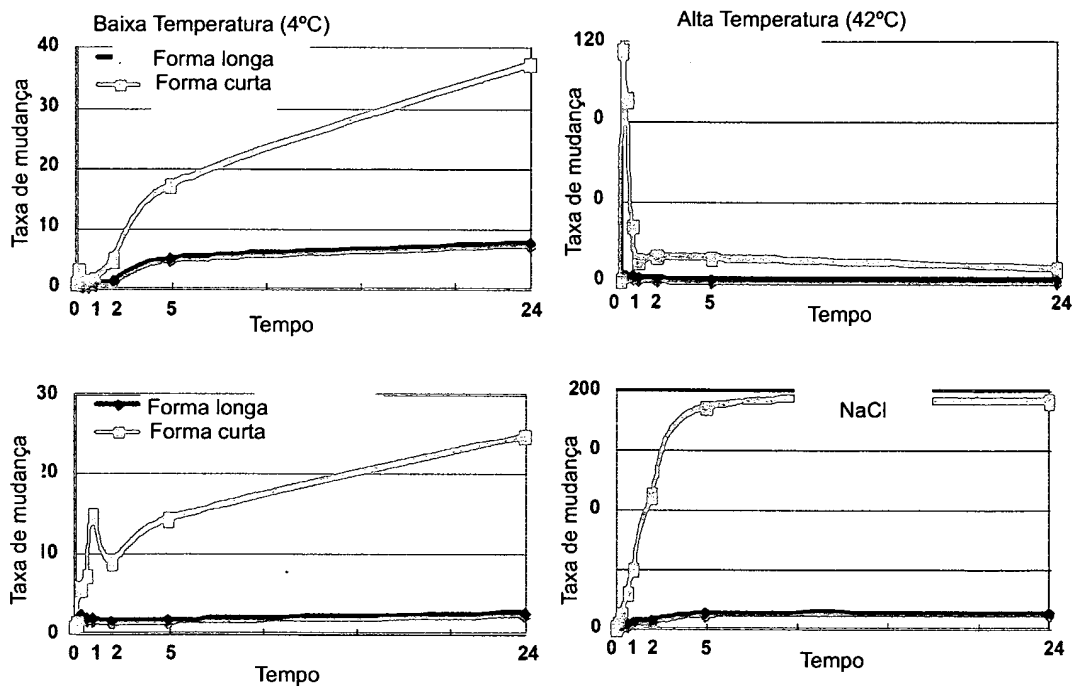


Fig. 4

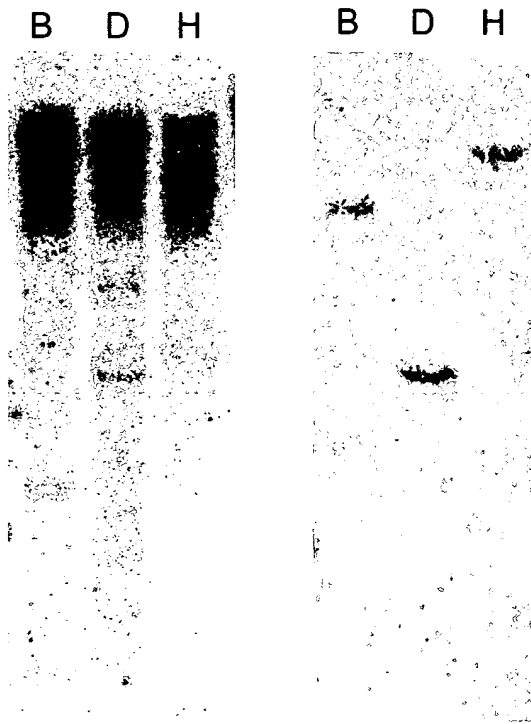


Fig. 5A

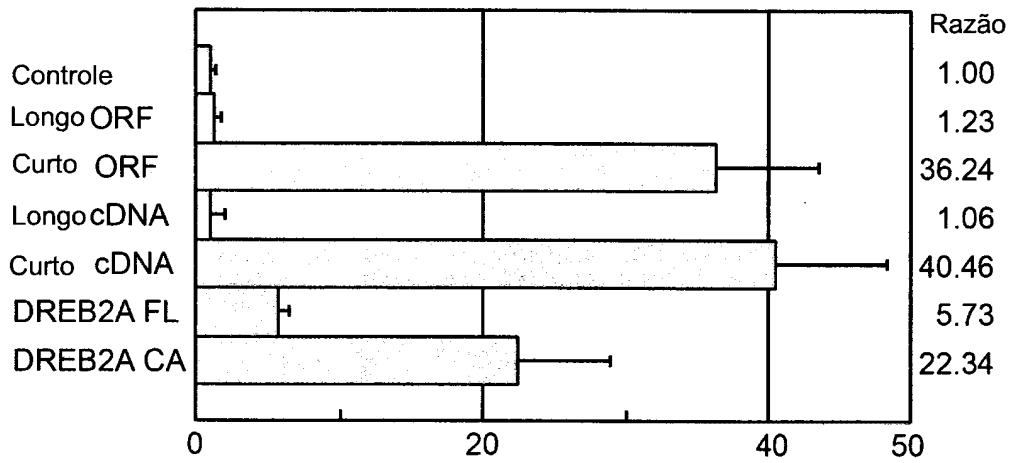


Fig. 5B

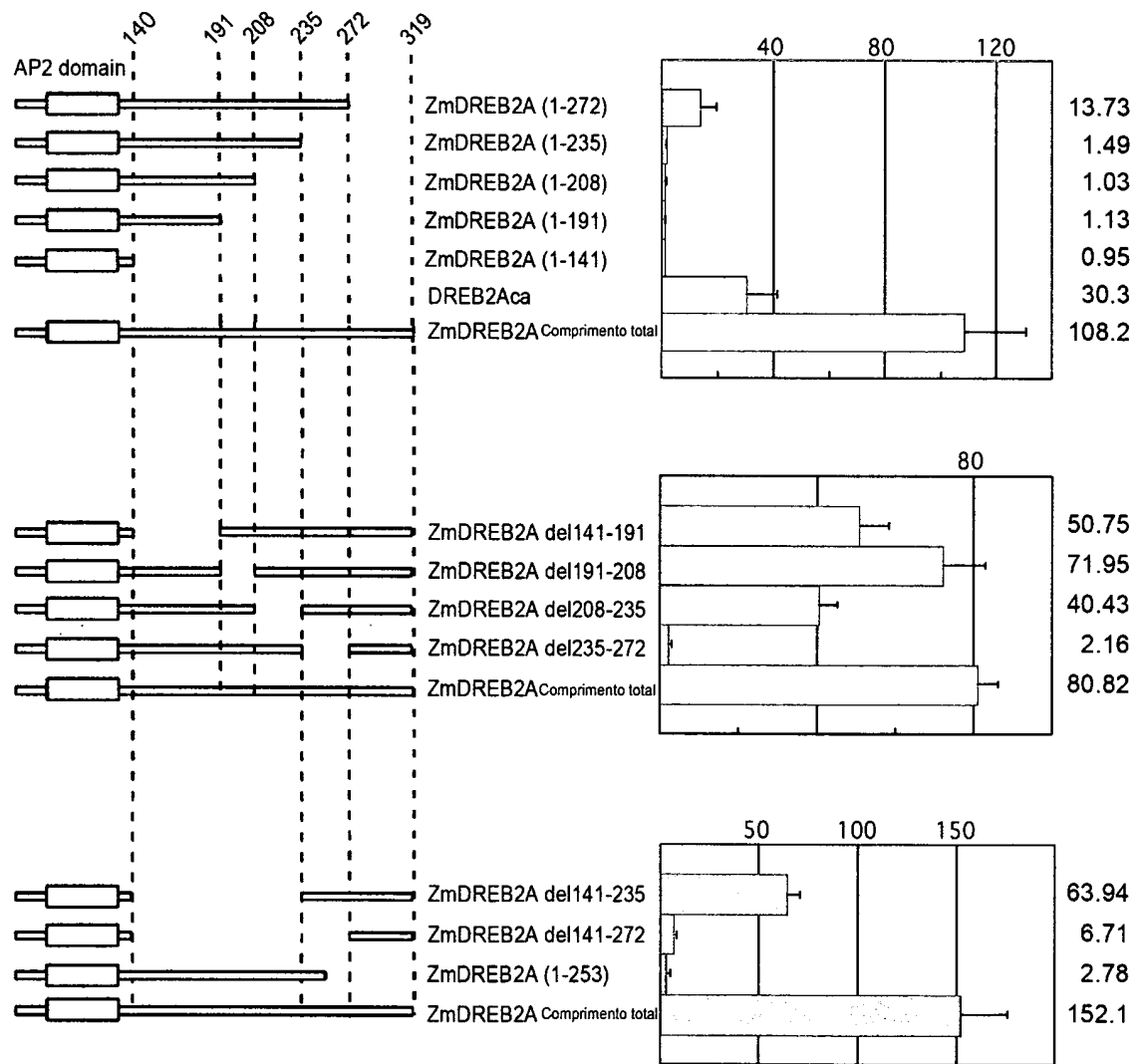


Fig. 6

```
ZmDREB2A 224:VFGPLEPI TNLPDGG-DG-FDIGEMLRMESDP 254
HvDRF1 288:VYEPLLEPI SNLPDGEAD-CFDIEELLKLEADP 319
OsDREB2B 303:VFEPLLEPI ASLPEDQGDYCFDIDEMLRMEADP 335
PgDREB2A 238:VFEPLLEPI ENLPEGDFDG-FDIDEMLRMEADP 269
*..***** .** . * *** *.*.**.**
```

Fig. 7

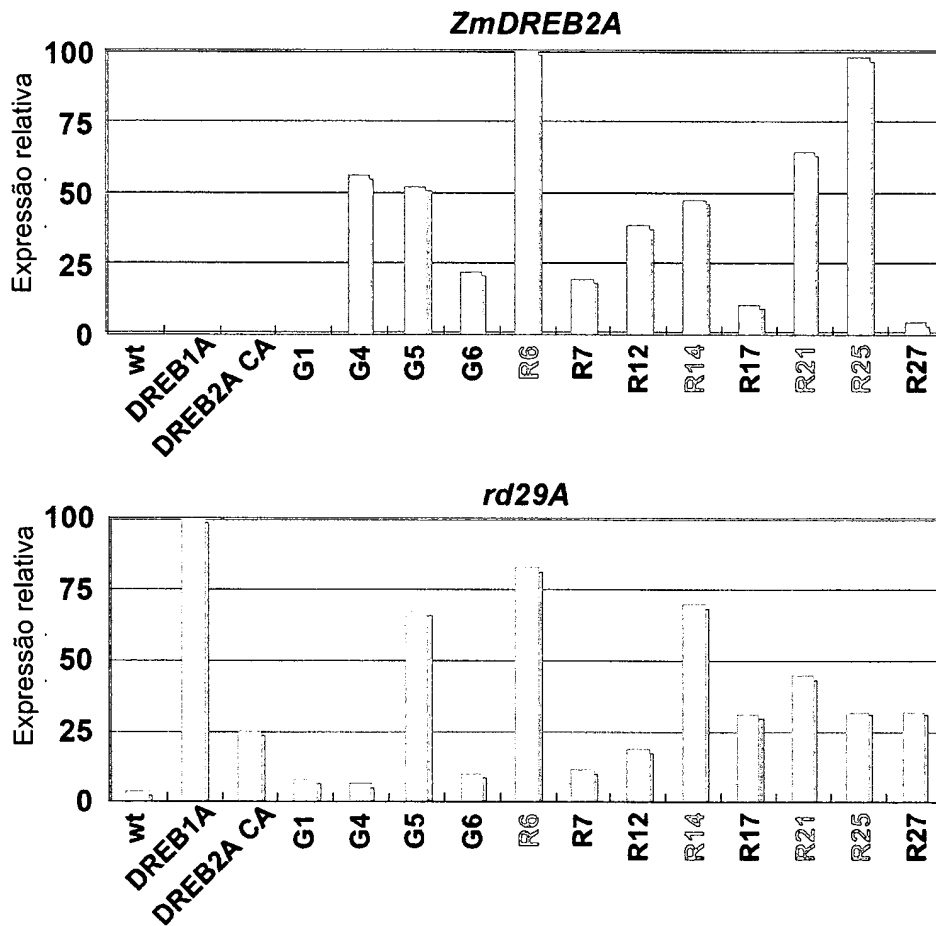


Fig. 8

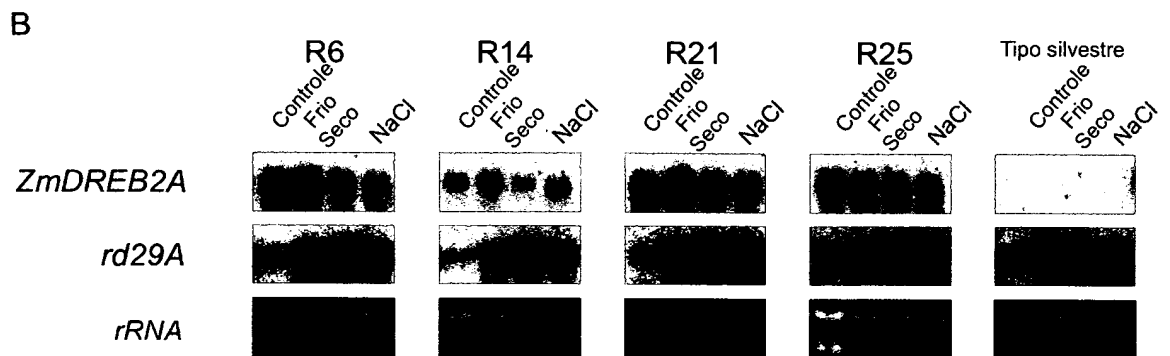
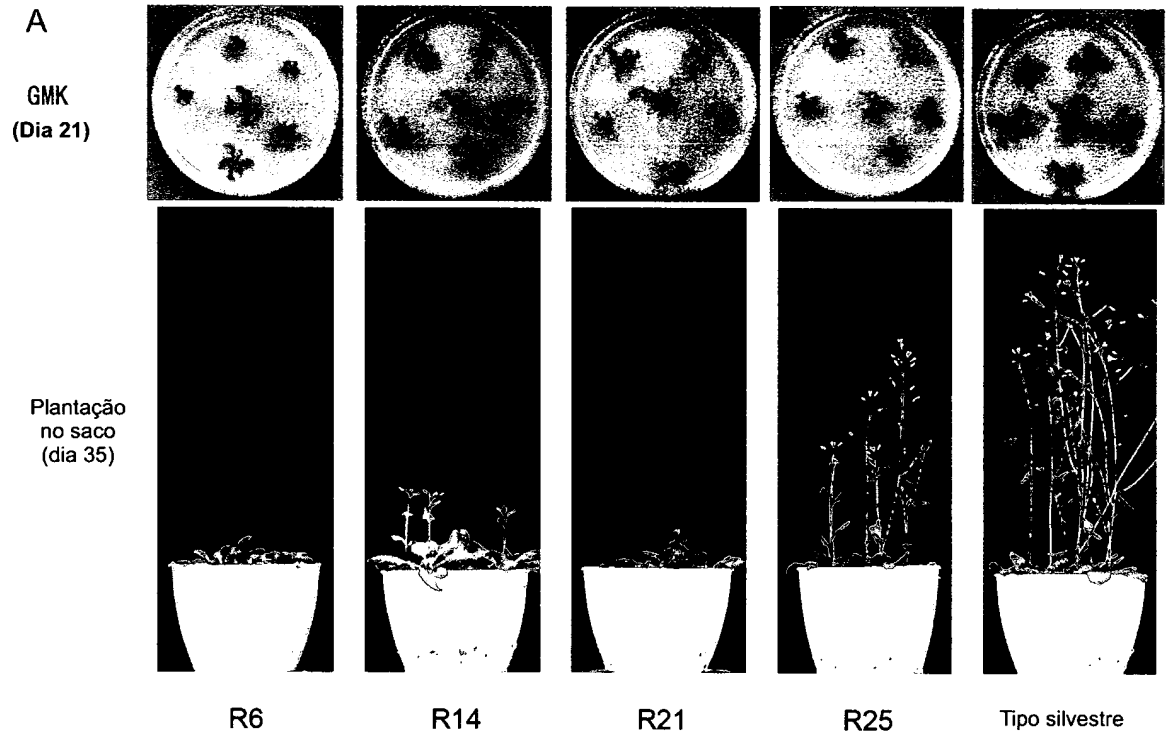


Fig. 9

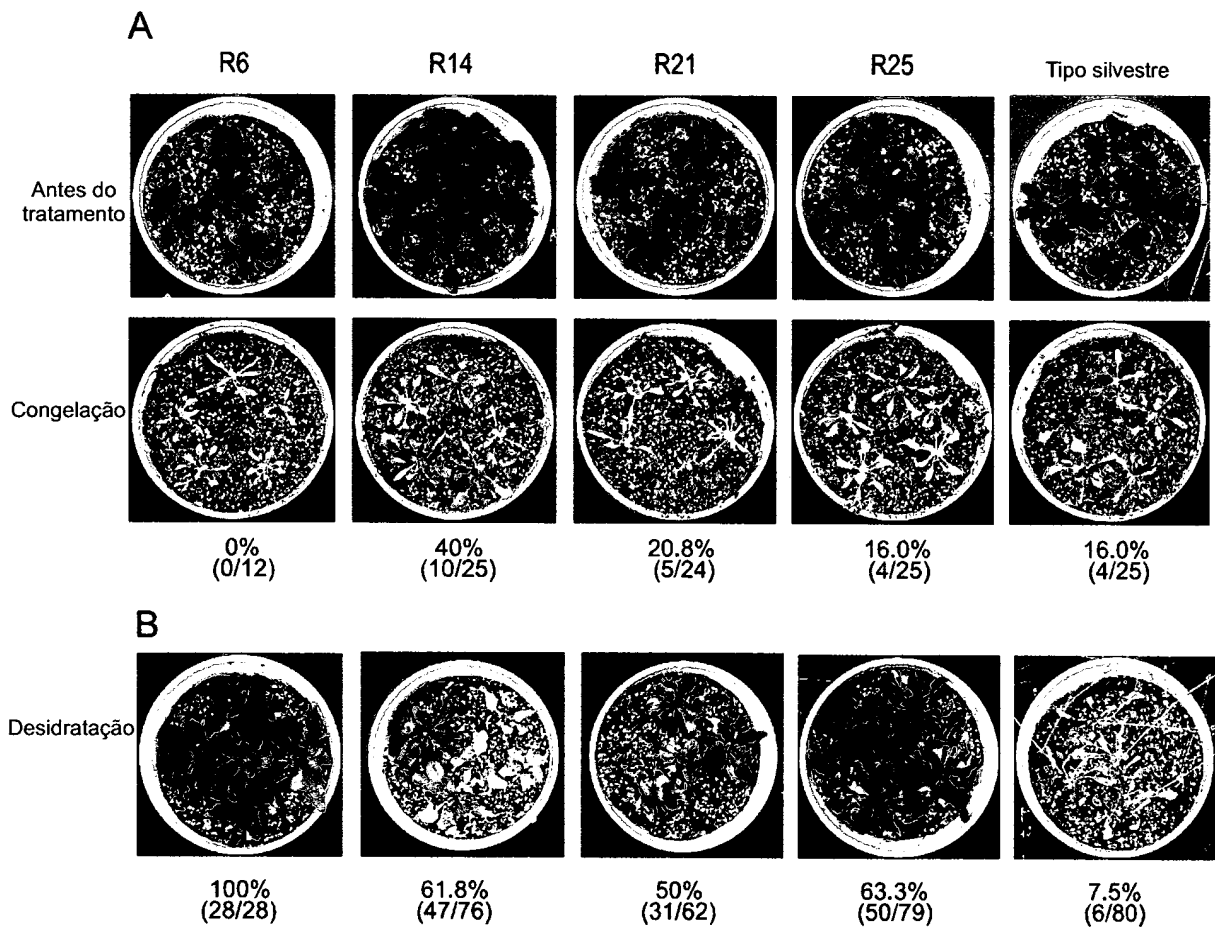
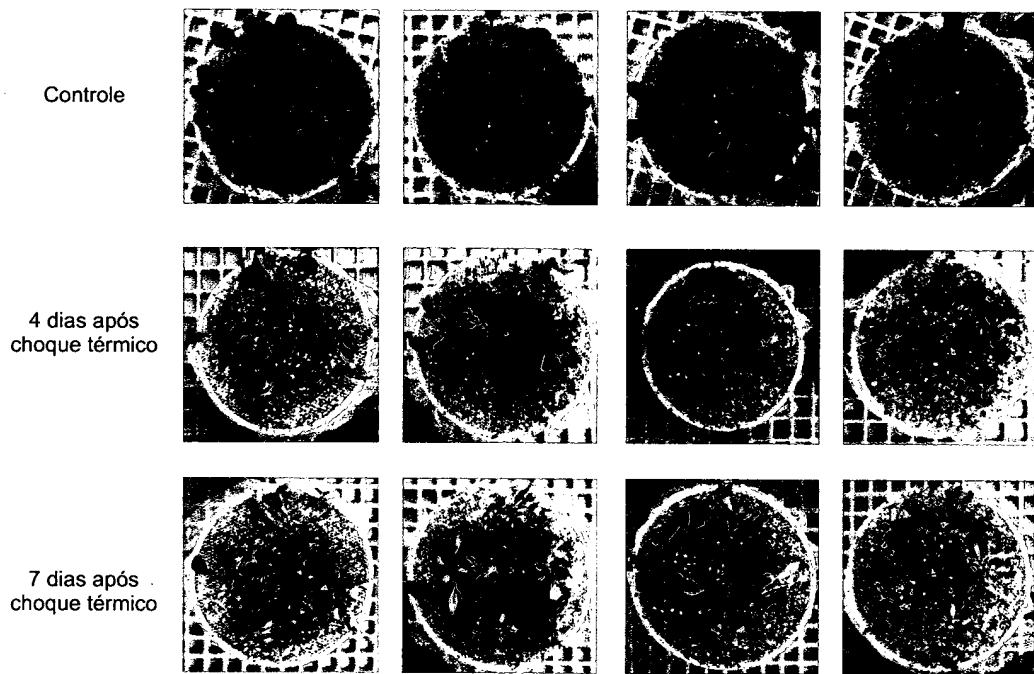


Fig. 10



Tipo silvestre
6-6 6-4
25-2 25-8

Fig. 11

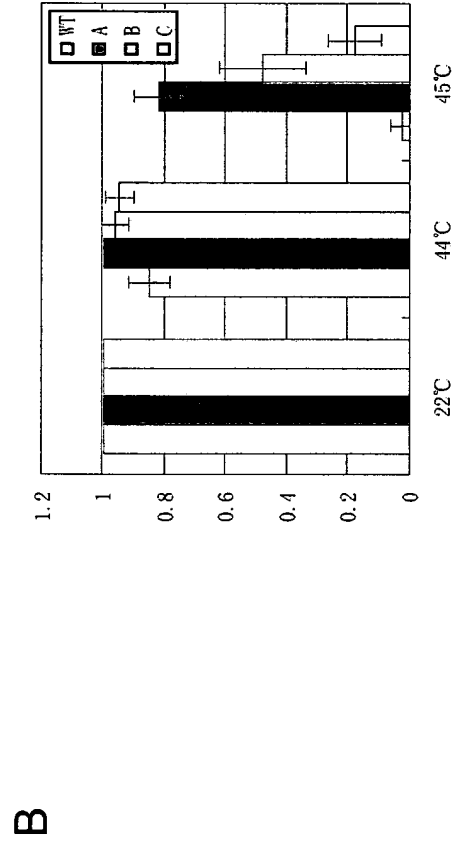
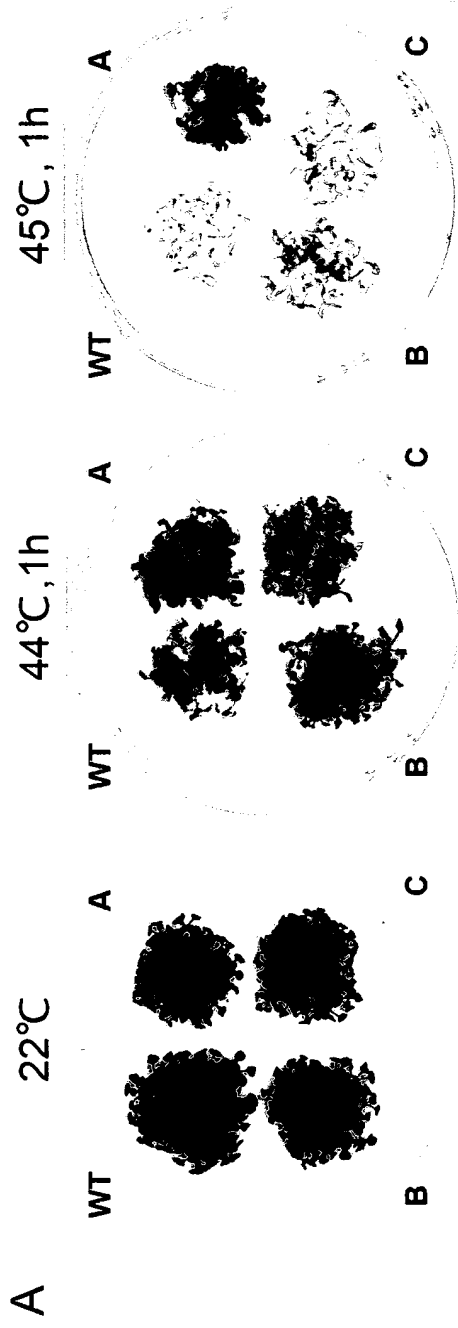


Fig. 12

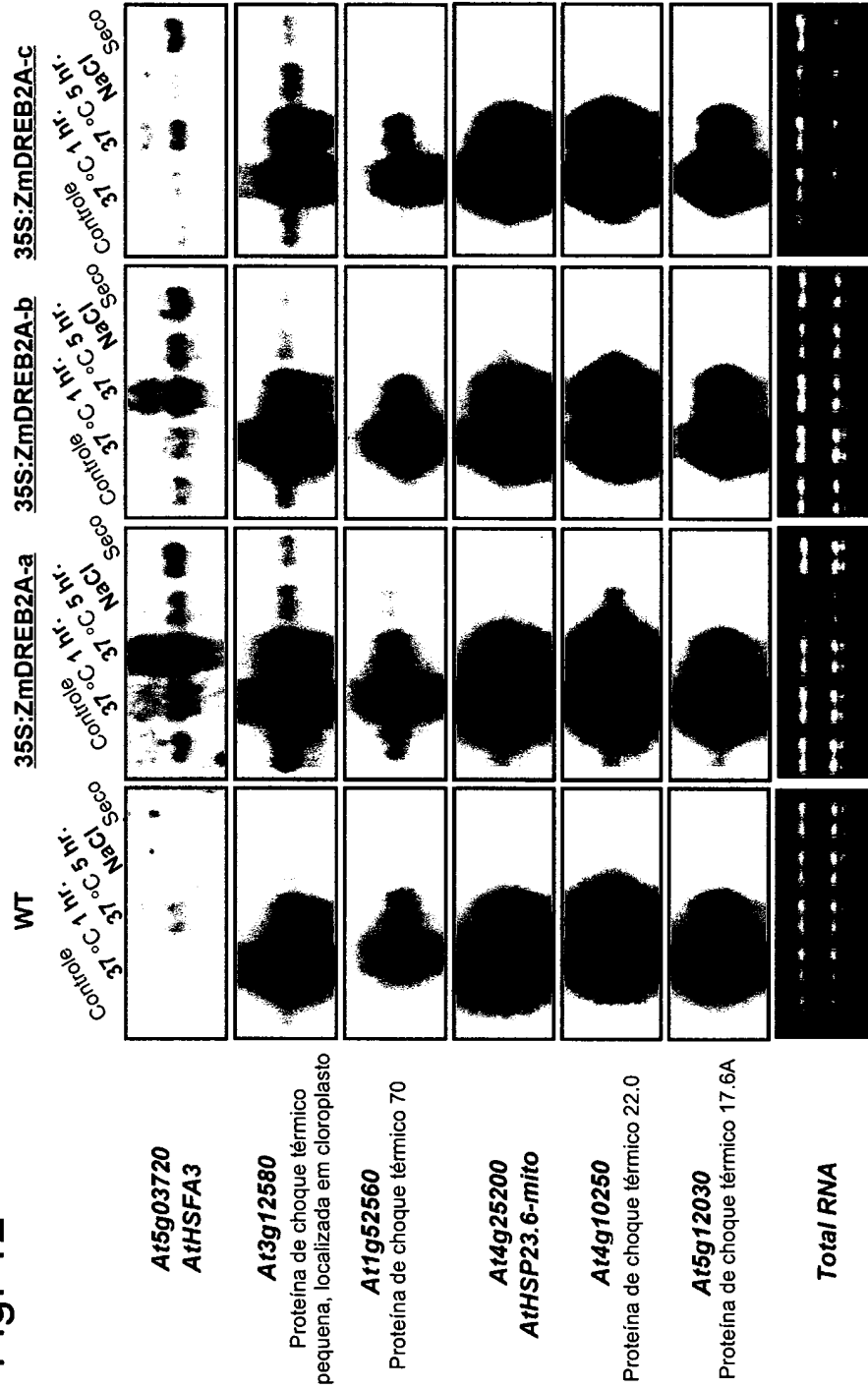


Fig. 13

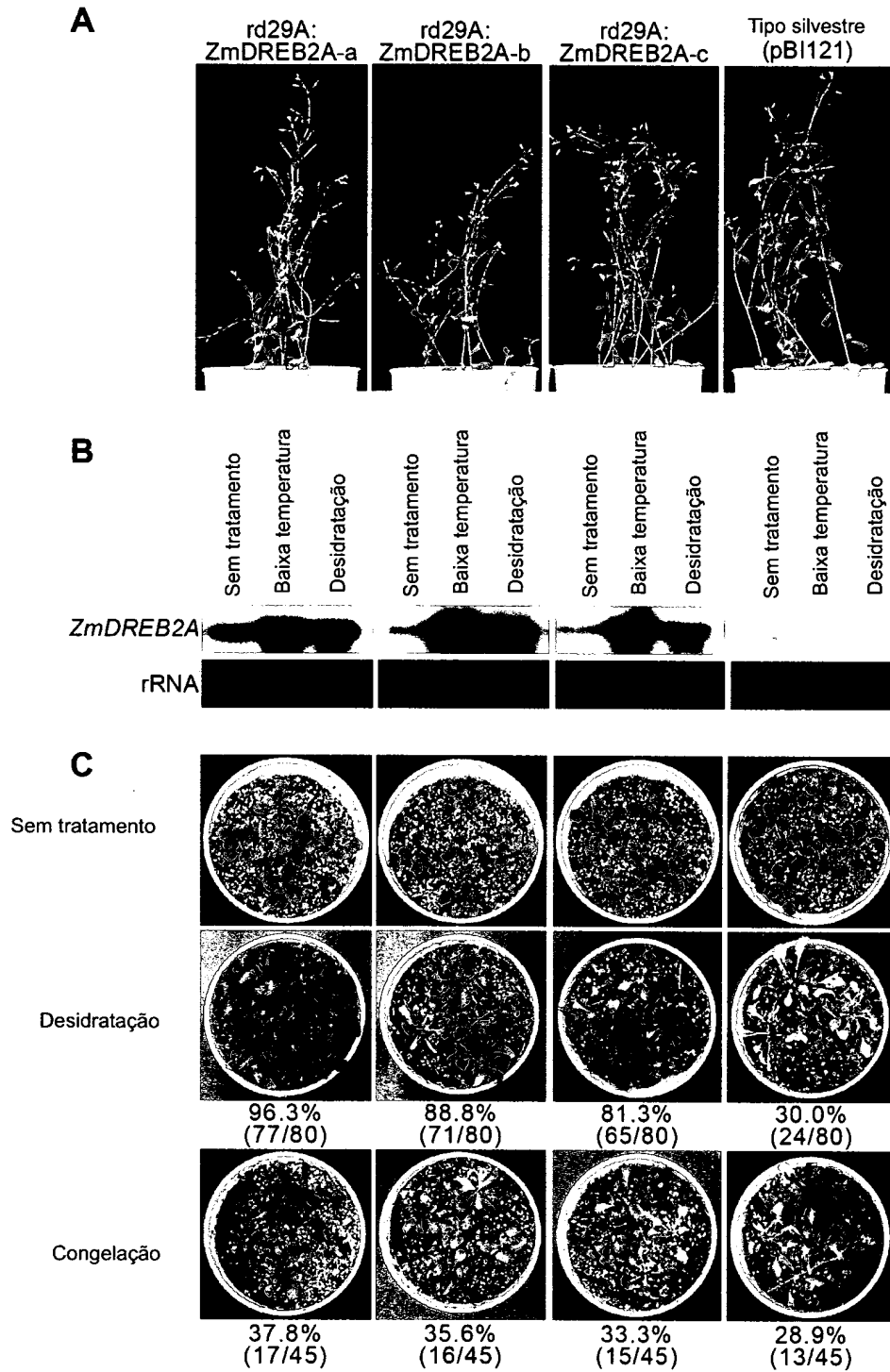
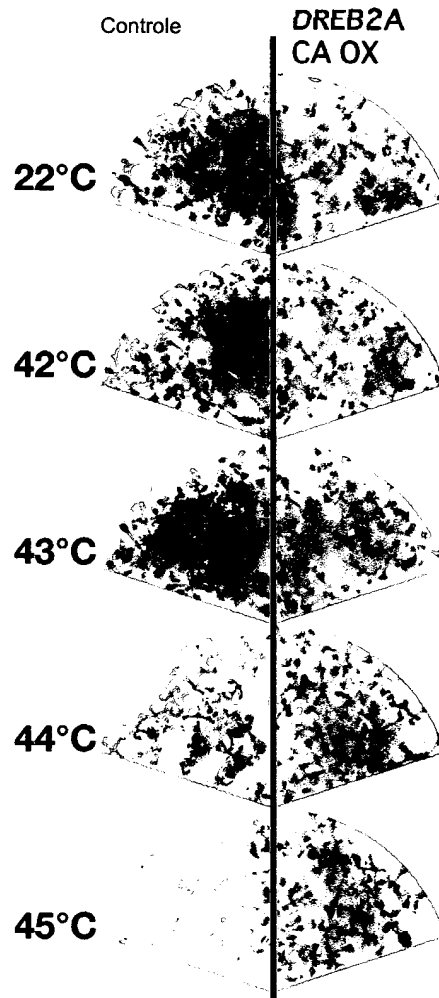


Fig. 14



Temperatura de tratamiento	Controle			DREB2A CA OX		
			%	N° de individuos sobrevivientes	N° total de individuos	%
22° C	78	78	100.0	65	73	89.0
42° C	73	75	97.3	75	76	98.7
43° C	53	53	100.0	74	74	100.0
44° C	38	50	76.0	75	75	100.0
45° C	1	50	2.0	74	75	98.7

RESUMO

Patente de Invenção: **"GENE, PROTEÍNA RECOMBINANTE, VETOR RECOMBINANTE, MÉTODOS PARA PREPARAR UMA PLANTA TRANSGÊNICA E PARA APERFEIÇOAR A TOLERÂNCIA A ESTRESSE DE UMA PLANTA"**.

5 A presente invenção refere-se a um fator de transcrição indutível por estresse, derivado de milho, a um gene que codifica o mesmo e a um método para usar o mesmo. Especificamente, a presente invenção põe à disposição um gene, que compreende o seguinte DNA (a) ou (b): (a) DNA que consiste na sequência de nucleotídeo, tal como mostrada na SEQ ID
10 NO: 1; ou (b) DNA derivado de milho que se hibridiza sob condições restritivas com DNA, constituído de uma sequência de nucleotídeo que é complementar ao DNA constituído da sequência de nucleotídeo, tal como mostrada na SEQ ID NO: 1 e codifica uma proteína, que regula a transcrição de um gene localizado a jusante de um elemento sensível a estresse. Além disso,
15 so, a presente invenção refere-se a uma planta transgênica com tolerância aperfeiçoada a estresses ambientais, tais como estresse por alta temperatura ou desidratação, na qual esse gene foi introduzido.