



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

(21) **PI 0712201-2 A2**

(22) Data de Depósito: 24/05/2007
(43) Data da Publicação: 10/01/2012
(RPI 2140)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/43

(54) Título: COMPOSIÇÕES PARA SILENCIAR A EXPRESSÃO DE GIBBERELLIN 2-OXIDASE E USOS DAS MESMAS

(30) Prioridade Unionista: 23/05/2006 US 60/802.516

(73) Titular(es): Ramot At Tel-Aviv University LTD

(72) Inventor(es): Adi Avni, Jonathan Dayan, Roni Aloni

(74) Procurador(es): Alexandre Ferreira

(86) Pedido Internacional: PCT IL2007000629 de 24/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/135685de
29/11/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES PARA SILENCIAR A EXPRESSÃO DE GIBBERELLIN 2-OXIDASE E USOS DAS MESMAS
A presente invenção proporciona uma sequência de ácido nucléico isolada que codifica a enzima gibberellin 2-oxidase (GA 2-oxidase) do *Hibiscus cannabinus*. Ademais, a presente invenção proporciona métodos de silenciar a expressão do gene de GA 2-oxidase por meio de interferência de RNA para aumentar as fibras nas plantas, em particular em kenaf.

“COMPOSIÇÕES PARA SILENCIAR A EXPRESSÃO DE GIBBERELLIN 2-OXIDASE E USOS DAS MESMAS”

Campo da Invenção

A presente invenção se refere a uma sequência de ácido nucléico isolada que co-
5 difica a enzima gibberellina 2-oxidase (GA 2-oxidase) do *Hibiscus cannabinus*. A presente invenção adicionalmente se refere a métodos de silenciar a expressão do Gene GA 2-oxidase útil para aumentar fibras em plantas.

Antecedentes da Invenção

Fibras de plantas são células alongadas com extremidades alongadas e paredes
10 celulares bastante espessas, intensamente lignificadas. Diversos produtos economicamente importantes tais como papel, cordame (cordas e cabos), e têxteis são derivados de fibras de plantas. As células de fibras funcionam como tecido de suporte nos troncos e raízes de plantas. As fibras são componentes do tecido esclerênquima, o qual também contém as “sclereids” mais curta e de parede espessa (caroços). As fibras são regularmente encontra-
15 das nos tecidos xilema (madeira) e floema (casca) dos caules e raízes monocotiledôneas e dicotiledôneas.

As fibras apresentam um grande alvo econômico estando entre os principais produtos comerciais das árvores. Em 1997, foi previsto que o consume global total de fibras de fabricação de papel aumentaria de cerca de 300 milhões de toneladas em 1998 a cerca
20 de 425 milhões de toneladas por volta do ano 2010.

A indução de formação de fibras é controlada pelos hormônios vegetais auxina e gibberellina produzidos nas folhas, e pela citoquinina produzida nas raízes. Auxina e gibberellina também controlam a formação e estrutura da lignina nas paredes celulares das fibras. Foi mostrado que a gibberellina é o sinal específico que induz as fibras tanto no xilema como no floema (Aloni, *Planta Physiol.* 63: 609 - 614, 1979; Aloni et al.,
25 *PlantPhysiol.* 94: 1743 - 1747, 1990).

As aplicações exógenas de hormônios vegetais parcialmente supera os obstáculos do lento crescimento das árvores em virtude de diferentes regulagens moleculares das plantas.

30 As gibberellinas (GAs) são um grupo de mais de 100 diterpenos tetracíclicos, alguns dos quais são reguladores endógenos essenciais que influenciam os processos de desenvolvimento através do ciclo de vida da planta, incluindo crescimento do broto, a expansão e o formato das folhas, florescência, e germinação da semente. A importância das GAs no controle do crescimento do broto é ilustrada por mutantes com deficiência de GA
35 de *Arabidopsis*, milho, e ervilha. Os referidos mutantes apresentam níveis reduzidos GA(s) ativos em comparação às plantas do tipo selvagem (wt) e internódios mais curtos os quais resultam em um fenótipo anão. O fenótipo dos referidos mutantes com deficiên-

cia de GA pode ser completamente restabelecido pela aplicação de uma GA ativa. A biossíntese de GAs em plantas ocorre através do trajeto isoprenóide do ácido mevalônico. Os níveis de gibberellin são principalmente regulados pelo controle de transcrição dos genes da biossíntese da gibberellin.

5 A enzima multifuncional GA 20-oxidase é uma enzima chave no controle da biossíntese de GA. A mesma catalisa a conversão em etapas das Gibberellins C20, GA12/GA53, por três oxidações sucessivas a GA9/GA20, que são os precursores imediatos das gibberellins bioativas, GA4 e GA1, respectivamente. A expressão do gene GA 20-oxidase é regulada a menor pela ação de GA1/4, sugerindo que a repressão direta
10 do produto final está envolvida na regulação do gene. A primeira etapa de degradação das GAs biológicas ativas envolve GA 2-oxidases que hidroxila a C-2 das GAs ativas. Genes de GA 2-oxidase foram clonados a partir de diversas espécies (Thomas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96 (1999) 4698 - 4703).

15 Um mutante delgado dotado de altos níveis de GAs exibe hiperalongamento. O gene DELGADO que codificam a GA 2-oxidase revelou o papel das GA 2-oxidases no controle dos níveis de GA. De fato, a super expressão da GA 2-oxidase em *Arabidopsis* ocasionou a redução nos níveis de GA resultando em fenótipos anão típicos de mutantes com deficiência de GA.

Atualmente, a maior parte da pesquisa genética relativa ao aumento de fibras esteve focalizada na super expressão da GA 20-oxidase. Em plantas transgênicas que super expressam GA 20-oxidase, níveis elevados das GAs tanto nas folhas como nos internódios foram medidos, demonstrando que a biossíntese de GA foi aumentada. As referidas plantas transgênicas mostram maior comprimento de fibra (Eriksson et al. Planta, 214: 920 - 930, 2002; Huang et al., Planta Physiol. 118: 773 - 781, 1998; e Biemelt et al., Planta
20 Physiol. 135: 254 - 265, 2004), e níveis extremamente elevados de GAs inativas, em virtude da catalise da GA 2-oxidase.

A Patente US No. 6,670,527 para Thomas et al., descreve seqüências de ácido nucléico que codificam Enzimas GA-2 oxidase em *Phaseolus coccineus* e *Arabidopsis thaliana* e as seqüências de amino ácidos das referidas GA 2-oxidases. A patente US No.
30 6,670,527 é direcionada a métodos de inibir o desenvolvimento da planta que compreendem transformar uma célula vegetal com um ácido nucléico que expressa um polipeptídeo vegetal dotado de Atividade de enzima GA 2-oxidase. A patente US No. 6,670,527 adicionalmente ensina seqüências de ácido nucléico antisentido e seqüências de ácido nucléico que codificam uma ribozima que pode ser útil para promover o desenvolvimento da planta ao evitar a desativação da gibberellin por GA 2-oxidase.
35

A Patente US No. 6,723,897 para Brown et al., descreve métodos para reduzir níveis de GA em plantas ao produzir plantas transgênicas dotadas de um transgene que

compreende uma seqüência que codifica GA 2-oxidase, o último inativa uma GA endógena.

A Patente US No. 4,507,144 para Aloni descreve um processo de aumentar a coleta de fibras de plantas que compreende aplicar às plantas em combinação uma auxina e gibberellin uma série de vezes, e coletar a safra após as plantas terem alcançado o estágio de crescimento desejado.

Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) é uma planta de crescimento anual rápido proximalmente relacionado ao algodão (*Gossypium hirsutum* L.) alcançando alturas de 4 metros - 6 metros dentro de 6 meses, e alcançando 5 toneladas - 10 toneladas de fibra seca/acre. A mesma é uma planta ambientalmente amigável que tem sido usada há muito tempo como uma fonte para a produção de cordame e cabos. Estudos com kenaf nos Estados Unidos estiveram em sua maioria relacionados com rendimento da produção. Embora algumas pesquisas dos anos 1970 e 1980 estiveram relacionadas ao uso de kenaf em papel de imprensa, a comercialização de kenaf em diversos produtos se tornou o foco principal nos últimos anos. Kenaf é uma fonte de fibras vantajosa uma vez que a mesma necessita de manutenção mínima e pouco ou nenhum herbicida em virtude de sua rápida germinação e florescimento. A densa copa de folhas na parte superior da planta impede o crescimento de ervas daninhas. Adicionalmente, kenaf necessita de cerca da mesma quantidade de fertilizante do que o algodão de altiplano e menos do que o milho. A maior parte das pestes por insetos não atacam o caule da planta fibrosa, e portanto, inseticidas não são necessários.

Com uma preocupação relativa à falta de estoque de madeira mole para abastecer o aumento da demanda para polpa e produtos de papel, kenaf é uma alternativa promissória à polpa. Na medida em que kenaf se desenvolve rapidamente, a referida planta é uma fonte de fibras melhor do que as árvores de pinho meridional, atualmente sendo usado para polpa nos Estados Unidos, na medida em que o tempo necessário para alcançar árvores de pinho meridionais varia de 7 anos a 40 anos.

Há uma necessidade ainda não alcançada de métodos eficazes e aprimorados para aumentar as fibras de casca (floema) e de madeira (xilema) em plantas em geral e em plantas kenaf (*Hibiscus cannabinus*), em particular.

SUMÁRIO DA PRESENTE INVENÇÃO

A presente invenção proporciona uma seqüência de ácido nucléico isolada que codifica a enzima gibberellin 2-oxidase (GA 2-oxidase) da *Hibiscus cannabinus* (kenaf) e uma seqüência de amino ácido da enzima. A presente invenção adicionalmente proporciona seqüências de ácido nucléico úteis para silenciar a expressão de gene da GA 2-oxidase em plantas e métodos de aumentar a coleta de fibras em plantas ao silenciar a expressão de gene da GA 2-oxidase.

É agora descrito pela primeira vez que a transformação de plantas *Arabidopsis* com um construtor de DNA projetado para gerar siRNAs direcionados ao gene GA 2-oxidase das plantas *Arabidopsis* resultou na produção de plantas transgênicas nas quais a expressão do gene GA 2-oxidase foi silenciada por interferência de RNA (RNAi). As plantas transgênicas *Arabidopsis* foram observadas ser mais altas do que as plantas *Arabidopsis* do tipo selvagem não transgênicas, os internódios das mesmas foram mais longos, e os mesmos floresceram mais rápido do que as plantas de contraparte selvagem. Adicionalmente, o número das células de fibras em caules das plantas *Arabidopsis* transgênicas foi mais elevado do que aquele das plantas do tipo selvagem.

É adicionalmente descrito que a transformação das plantas de tabaco com um construtor de DNA projetado para gerar siRNAs direcionados ao gene GA 2-oxidase das plantas de tabaco resultou na produção de plantas transgênicas nas quais a expressão do gene GA 2-oxidase foi silenciada. As plantas de tabaco transgênicas foram observadas ser mais altas do que as plantas de tabaco não transgênicas do tipo selvagem. As folhas das plantas de tabaco transgênicas foram mais longas do que aquelas das plantas do tipo selvagem.

É agora descrito que as plantas transgênicas *Arabidopsis* e tabaco nas quais a GA 2-oxidase é silenciada exibiram características fenotípicas similares àquelas das plantas transgênicas *Arabidopsis* e tabaco nas quais a GA 20-oxidase é super expressa. Assim, a presente invenção surpreendentemente descreve que o aumento a nível da gibberellin em plantas em virtude de silenciar a expressão do gene GA 2-oxidase produz desenvolvimento mais acelerado e plantas mais altas que são dotadas de um teor mais alto de fibras de floema e/ou xilema do que as plantas não transgênicas do tipo selvagem.

A presente invenção adicionalmente descreve uma seqüência de DNA que codifica uma enzima GA 2-oxidase do *Hibiscus cannabinus* (kenaf) como determinado na SEQ ID NO: 1, a seqüência de amino ácido da enzima GA 2-oxidase de kenaf como determinado na SEQ ID NO: 2, e a seqüência genômica da GA 2-oxidase de kenaf como determinado na SEQ ID NO: 3. A presente invenção adicionalmente descreve Seqüências de DNA capazes de gerar Moléculas de RNA capazes de inibir a expressão de genes de GA 2-oxidase de diversas plantas. As seqüências de DNA são úteis para transformar plantas de modo a silenciar a expressão de gene GA 2-oxidase de modo que o nível da gibberellin nas referidas plantas é reduzido e a quantidade e densidade das fibras nas plantas transformadas são superiores àquelas das plantas de controle. As referidas plantas transformadas podem ser uma fonte valiosa de polpa e fibra. As seqüências de DNA da presente invenção são particularmente úteis para transformar plantas kenaf.

A presente invenção é aqui exemplificada em plantas *Arabidopsis* e de tabaco. Entretanto, qualquer planta usada comercialmente como uma fonte de fibras pode ser

uma fonte melhor e enriquecida de fibra após ser transformada com um construtor de DNA capaz de gerar siRNAs direcionados ao gene GA 2-oxidase daquela planta, e é assim no âmbito da presente invenção.

De acordo com um primeiro aspecto, a presente invenção proporciona uma molécula de ácido nucléico isolada que compreende a seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 1 que codifica a enzima gibberellin 2-oxidase (GA 2-oxidase) do *Hibiscus cannabinus* (kenaf), um fragmento, uma fita complementar ou uma seqüência homóloga da mesma, onde a seqüência homóloga é dotada de uma identidade de seqüência de pelo menos 80% para uma SEQ ID NO: 1. De acordo com algumas modalidades, a seqüência homóloga é dotada de uma identidade de seqüência de pelo menos 90%, alternativamente de pelo menos 95%, alternativamente de 100% para uma SEQ ID NO: 1. De acordo com uma determinada modalidade, a molécula de ácido nucléico isolada é dotada de uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 1 que codifica uma GA 2-oxidase de kenaf. De acordo com outra modalidade, o nucléico isolado compreende o nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 4.

De acordo com um aspecto adicional, a presente invenção proporciona um polipeptídeo de GA 2-oxidase isolado de kenaf (*Hibiscus cannabinus*) que compreende a seqüência de amino ácido como determinado na SEQ ID NO: 2, ou um análogo ou fragmento da mesma, onde o análogo é dotado da homologia de seqüência de amino ácido de pelo menos 80%, alternativamente de pelo menos 90%, alternativamente de pelo menos 95%, ou de 100% para uma SEQ ID NO: 2. De acordo com uma determinada modalidade, o polipeptídeo de GA 2-oxidase isolado de kenaf é dotado de uma seqüência de amino ácido como determinado na SEQ ID NO: 2.

De acordo com um aspecto adicional, a presente invenção proporciona uma molécula de ácido nucléico que codifica uma GA 2-oxidase de kenaf (*Hibiscus cannabinus*) dotada de uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 3.

De acordo ainda com um outro aspecto, a presente invenção proporciona uma molécula de RNA de dupla fita que regula a menor a expressão do gene GA 2-oxidase de *Hibiscus cannabinus* (kenaf) que compreende:

a) uma primeira fita de RNA do RNA de dupla fita que compreende pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de seqüência para um RNA transcrito a partir de um gene GA 2-oxidase de kenaf ou um fragmento do mesmo; e

b) uma segunda fita de RNA do referido RNA de dupla fita que compreende pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência complementar do RNA transcrito a partir do gene GA 2-oxidase de kenaf ou um fragmento do mesmo, onde a primeira e a segunda fita de RNA são

capazes de hibridizar uma na outra para formar a referida molécula de RNA de dupla fita.

De acordo com algumas modalidades, as primeira e segunda fitas de RNA cada uma das quais compreende pelo menos 25 nucleotídeos, alternativamente pelo menos 50 nucleotídeos, alternativamente pelo menos 100 nucleotídeos, alternativamente pelo menos 400 nucleotídeos. De acordo com modalidades adicionais, a primeira fita de RNA é dotada de pelo menos 95% de identidade de sequência, alternativamente 100% de identidade de sequência, para o RNA transcrito a partir do gene GA 2-oxidase de kenaf ou um fragmento do mesmo. De acordo ainda com modalidades adicionais, a segunda fita de RNA é dotada de pelo menos 95% de identidade de sequência, alternativamente 100% de identidade de sequência, para uma sequência complementar do RNA transcrito a partir do gene GA 2-oxidase de kenaf ou um fragmento do mesmo. De acordo ainda com modalidades adicionais, o RNA transcrito a partir do gene GA 2-oxidase compreende a sequência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 1. De acordo com uma modalidade, a primeira fita de RNA é dotada de pelo menos 90% de identidade de sequência para um RNA transcrito a partir de um ácido nucléico que compreende a sequência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 4 ou um fragmento do mesmo. De acordo com outra modalidade, a segunda fita de RNA é dotada de pelo menos 90% de identidade de sequência para um RNA transcrito a partir de um ácido nucléico que compreende a sequência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 38 ou um fragmento do mesmo.

De acordo com um aspecto adicional, a presente invenção proporciona um construtor de DNA para gerar uma molécula de RNA capaz de regular a menor a expressão de um gene GA 2-oxidase de kenaf, o construtor de DNA que compreende um promotor de planta operacionalmente ligado a uma sequência de polinucleotídeo que codifica uma sequência de RNA que forma um RNA de dupla fita, a sequência de polinucleotídeo compreende:

- (i) uma primeira sequência de nucleotídeo que compreende pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de sequência a uma sequência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 1 ou um fragmento do mesmo, e
- (ii) uma segunda sequência de nucleotídeo que compreende pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de sequência a uma sequência complementar da sequência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 1 ou um fragmento do mesmo,

onde uma molécula de RNA transcrita a partir do construtor de DNA regula a menor a expressão do gene GA 2-oxidase de kenaf.

De acordo com algumas modalidades adicionais, as primeira e segunda sequências de nucleotídeos cada uma das quais compreende pelo menos 25 nucleotídeos,

alternativamente pelo menos 50 nucleotídeos, alternativamente pelo menos 100 nucleotídeos. De acordo com modalidades adicionais, a primeira seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 95% de identidade de seqüência, alternativamente 100% de homologia de seqüência a uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 1 ou um fragmento do mesmo. De acordo com outras modalidades, a segunda seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 95% de identidade de seqüência, alternativamente 100% de homologia de seqüência para uma seqüência complementar da seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 1 ou um fragmento do mesmo.

De acordo com algumas modalidades, a primeira seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90%, alternativamente 95% de identidade de seqüência a uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 4 ou um fragmento do mesmo. De acordo com modalidades adicionais, a segunda seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90%, alternativamente 95% de identidade de seqüência a uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 38 ou um fragmento do mesmo.

De acordo com modalidades adicionais, o promotor de planta é selecionado a partir do grupo que consiste em promotores constitutivos, promotores induzíveis, promotores específicos de tecido, e promotores específicos de estágio de desenvolvimento.

De acordo ainda com modalidades adicionais, o construtor de DNA adicionalmente compreende um marcador selecionável. De acordo com uma determinada modalidade, o marcador selecionável é uma seqüência de polinucleotídeo que codifica um produto que confere resistência a antibiótico.

De acordo ainda com modalidades adicionais, o construtor de DNA adicionalmente compreende uma seqüência de controle de expressão selecionada a partir do grupo que consiste em um intensificador, um fator de transcrição, e um sinal terminador de transcrição.

De acordo ainda com modalidades adicionais, as primeira e segunda seqüências de nucleotídeos do construtor de DNA são operacionalmente ligadas ao mesmo promotor. De acordo com modalidades adicionais, as primeira e segunda seqüências de nucleotídeos são separadas por uma seqüência espaçadora. De acordo com determinadas modalidades, a seqüência espaçadora é derivada de um íntron.

De acordo com outro aspecto, a presente invenção proporciona uma seqüência de oligonucleotídeo direcionada a uma região da seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 3 ou uma fita complementar da mesma, onde a seqüência de oligonucleotídeo capaz de especificamente hibridizar com a região da seqüência de nucleotídeo ou fita complementar da mesma, deste modo inibindo a expressão da GA 2-oxidase.

De acordo com algumas modalidades, a região da sequência de nucleotídeo é selecionada a partir do grupo que consiste em região não traduzida 5', região de codificação, região de parada de códon, e a região não traduzida 3'. De acordo com determinadas modalidades, a sequência de oligonucleotídeo compreende pelo menos 20 nucleotídeos.

De acordo com modalidades adicionais, a sequência de oligonucleotídeo compreende pelo menos uma ligação internucleosídeo modificada. Alternativamente, a sequência de oligonucleotídeo compreende pelo menos um açúcar modificado. Preferivelmente, a sequência de oligonucleotídeo é ligada a um promotor de planta, onde o promotor de planta é operacionalmente ligado a sequência de oligonucleotídeo antisentido.

De acordo com outro aspecto, a presente invenção proporciona uma sequência de oligonucleotídeo antisentido direcionada a uma região da sequência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 3 ou uma fita complementar da mesma, onde a sequência de oligonucleotídeo antisentido é capaz de especificamente hibridizar com a região da sequência de nucleotídeo ou fita complementar da mesma, deste modo inibindo a expressão da GA 2-oxidase.

De acordo com algumas modalidades, a região da sequência de nucleotídeo é selecionada a partir do grupo que consiste na região não traduzida 5', região de codificação, região de parada de códon, e a região não traduzida 3'. De acordo com determinadas modalidades, a sequência de oligonucleotídeo antisentido compreende pelo menos 20 nucleotídeos. Deve ser apreciado que a sequência de oligonucleotídeo pode consistir de cerca de 500 nucleotídeos de comprimento.

De acordo com modalidades adicionais, a sequência de oligonucleotídeo antisentido compreende pelo menos uma ligação internucleosídeo modificada. Alternativamente, a sequência de oligonucleotídeo compreende pelo menos um açúcar modificado. Preferivelmente, a sequência de oligonucleotídeo é ligada a um promotor de planta, onde o promotor de planta é operacionalmente ligado a uma sequência de oligonucleotídeo antisentido.

De acordo com um aspecto adicional, a presente invenção proporciona uma sequência de nucleotídeo que codifica uma ribozima capaz de clivar especificamente uma sequência de RNA transcrito a partir de uma molécula de ácido nucléico que compreende a sequência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 1.

De acordo com outro aspecto, a presente invenção proporciona uma célula vegetal transformada com um RNA de dupla fita da presente invenção; ou com um construtor de DNA da presente invenção; ou com uma sequência de oligonucleotídeo antisentido da presente invenção; ou com a sequência de nucleotídeo que codifica uma ribozima da presente invenção, a expressão do gene GA 2-oxidase é regulada a menor. De acordo com uma

modalidade, a célula vegetal é uma célula vegetal de kenaf.

De acordo com um aspecto adicional, a presente invenção proporciona uma planta transgênica que compreende pelo menos uma célula transformada com um RNA de dupla fita da presente invenção; ou com um construtor de DNA para gerar RNAs da presente invenção; ou com uma sequência de oligonucleotídeo antisentido da presente invenção; ou com a sequência de nucleotídeo que codifica uma ribozima da presente invenção, a expressão do gene GA 2-oxidase é regulada a menor. De acordo com uma modalidade, a planta transgênica é uma planta de kenaf.

De acordo com um aspecto adicional, a presente invenção proporciona uma semente de uma planta transgênica de acordo com os princípios da presente invenção. De acordo com uma modalidade, a semente de uma planta transgênica é uma semente de uma planta transgênica de kenaf.

De acordo com outro aspecto, a presente invenção proporciona um caule de uma planta transgênica de acordo com os princípios da presente invenção. De acordo com uma modalidade, o caule de uma planta transgênica é um caule de uma planta transgênica de kenaf.

De acordo com um aspecto adicional, a presente invenção proporciona um método para produzir uma planta transgênica dotada de reduzida expressão de gene GA 2-oxidase por regular a menor GA 2-oxidase, o método compreende introduzir em pelo menos uma célula vegetal um construtor de DNA que compreende um promotor de planta operacionalmente ligado a uma sequência de polinucleotídeo que codifica uma sequência de RNA, a sequência de polinucleotídeo compreendendo:

(i) uma primeira sequência de nucleotídeo que compreende pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de sequência a uma molécula de ácido nucléico que codifica uma GA 2-oxidase da planta ou um fragmento da mesma; e

(ii) uma segunda sequência de nucleotídeo que compreende pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de sequência a uma sequência complementar da molécula de ácido nucléico que codifica uma GA 2-oxidase da planta ou um fragmento da mesma,

onde uma molécula de RNA transcrito a partir do construtor de DNA regula a menor a expressão do referido gene GA 2-oxidase.

De acordo com algumas modalidades, a planta transgênica é selecionada a partir do grupo que consiste em famílias de angiosperma e famílias de gimnosperma. De acordo com modalidades adicionais, a planta transgênica é selecionada a partir do grupo que consiste em *Hibiscus* sp., *Populus* sp., *Eucalyptus* sp., *Helianthus* sp., *Corchorus* sp., e *Boehmeria* sp. De acordo ainda com modalidades adicionais, a planta transgênica é

selecionada a partir do grupo que consiste em kenaf, *Helianthus annuus* L. (Sunflower), *Eucalyptus camaldulensis*, *Cannabis sativa* L., *Corchorus olitorius* L., e *Boehemeria nivea* L. De acordo com uma determinada modalidade a planta transgênica é uma planta de kenaf. De acordo com modalidades adicionais, se a planta transgênica for uma planta de kenaf, o

5 construtor de DNA é de acordo com os princípios da presente invenção.

De acordo com outras modalidades, se a planta transgênica for *Arabidopsis*, a primeira seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 35 ou um fragmento da mesma, e a segunda seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de

10 identidade de seqüência a uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 39 ou um fragmento da mesma. De acordo com modalidades adicionais, se a planta transgênica for tabaco, a primeira seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 36 ou um fragmento da mesma, e a segunda seqüência de nucleotídeo

15 é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 40 ou um fragmento da mesma. De acordo ainda com modalidades adicionais, se a planta for tomate, a primeira seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 37 ou um fragmento da mesma, e a segunda seqüência

20 de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 41 ou um fragmento da mesma.

De acordo com um aspecto adicional, a presente invenção proporciona um método para produzir uma planta transgênica dotada de reduzida expressão de gene GA 2-oxidase por regular a menor GA 2-oxidase, o método compreende introduzir em pelo menos uma

25 célula vegetal um RNA de dupla fita da presente invenção; ou uma seqüência de oligonucleotídeo antisentido da presente invenção; ou a seqüência de nucleotídeo que codifica uma ribozima da presente invenção, deste modo produzindo uma planta transgênica dotada de níveis mais altos da gibberellin e níveis mais baixos da expressão do gene GA 2-oxidase do que uma planta não transgênica. De acordo com algumas modalidades, o método para produzir uma planta transgênica adicionalmente compreende uma etapa de

30 introduzir em uma planta transgênica uma quantidade eficaz de aumento de fibra da gibberellin ou/e auxina. De acordo com modalidades adicionais, o método para produzir uma planta transgênica adicionalmente compreende uma etapa de introduzir em pelo menos uma célula vegetal uma molécula de ácido nucléico que codifica gibberellin 20-oxidase. De

35 acordo com uma modalidade a planta transgênica é kenaf.

De acordo com algumas modalidades, introduzir o RNA de dupla fita da presente invenção; ou o construtor de DNAs da presente invenção; ou a seqüência de oligonucleotí-

deos antisentido da presente invenção; ou a seqüência de nucleotídeos que codifica uma ribozima da presente invenção, é realizada por um método selecionado a partir do grupo que consiste em transformação mediada a *Agrobacterium*, bombardeio de microprojétil, transformação mediada a pólen, transformação mediada a vírus de RNA de planta, transformação mediada a lipossomo, transferência direta de gene, e eletroporação dos caules embriogênicos compactos.

De acordo com um aspecto adicional, a presente invenção proporciona um método para aumentar a coleta de fibras da planta que compreende introduzir em pelo menos uma célula vegetal um construtor de DNA que compreende um promotor de planta operacionalmente ligado a uma seqüência de polinucleotídeo que codifica uma seqüência de RNA, a seqüência de polinucleotídeo que compreende:

(i) uma primeira seqüência de nucleotídeo que compreende pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma molécula de ácido nucléico que codifica uma GA 2-oxidase da planta ou um fragmento da mesma, e

(ii) uma segunda seqüência de nucleotídeo que compreende pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência complementar da molécula de ácido nucléico que codifica uma GA 2-oxidase da referida planta ou um fragmento da mesma,

onde o RNA transcrito a partir do construtor de DNA regula a menor a expressão do gene GA 2-oxidase.

De acordo com algumas modalidades, a primeira seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 95%, alternativamente 100%, identidade de seqüência a uma molécula de ácido nucléico que codifica a referida GA 2-oxidase ou um fragmento da mesma. De acordo com modalidades adicionais, a segunda seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 95%, alternativamente 100% de identidade de seqüência ou 100% de homologia para uma seqüência complementar da molécula de ácido nucléico que codifica a referida GA 2-oxidase ou um fragmento da mesma.

De acordo com modalidades adicionais, a planta é selecionada a partir do grupo que consiste em famílias de angiosperma e famílias de gimnosperma. De acordo com modalidades adicionais, as famílias de angiosperma incluem, mas não são limitadas a, *Hibiscus* sp., *Populus* sp., *Eucalyptus* sp., *Helianassim* sp., *Corchorus* sp., e *Boehemeria* sp. De acordo com modalidades adicionais, a planta é selecionada a partir do grupo que consiste em de kenaf, *Helianassim annuus* L. (Sunflower), *Eucaliptus camaldulensis*, *Cannabis sativa* L., *Corchorus olitorius* L., e *Boehemeria nivea* L. De acordo com uma determinada modalidade, a planta é uma planta de kenaf. De acordo com modalidades adicionais, se a planta transgênica for uma planta de kenaf, o construtor de DNA é de acordo com os princípios da presente invenção.

De acordo com outras modalidades, se a planta transgênica for *Arabidopsis*, a primeira seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 35 ou um fragmento da mesma, e a segunda seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 39 ou um fragmento da mesma. De acordo com modalidades adicionais, se a planta transgênica for tabaco, a primeira seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 36 ou um fragmento da mesma, e a segunda seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 40 ou um fragmento da mesma. De acordo ainda com modalidades adicionais, se a planta for tomate, a primeira seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 37 ou um fragmento da mesma, a segunda seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 41 ou um fragmento da mesma.

De acordo com outro aspecto, a presente invenção proporciona um vetor de expressão que compreende uma molécula de ácido nucléico isolada que compreende a seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 1 que codificam a GA 2-oxidase de kenaf, ou uma fita complementar ou uma seqüência homóloga da mesma, onde a seqüência homóloga é dotada de uma identidade de seqüência de pelo menos 80% para SEQ ID NO: 1. De acordo com algumas modalidades, a seqüência homóloga dentro do vetor de expressão é dotada de uma identidade de seqüência de pelo menos 90%, alternativamente de pelo menos 95%, alternativamente de 100% para SEQ ID NO: 1. De acordo com uma determinada modalidade, o vetor de expressão compreende uma molécula de ácido nucléico isolada dotada de uma seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 1 que codifica uma GA 2-oxidase de kenaf.

De acordo com um aspecto adicional, a presente invenção proporciona uma célula vegetal dotada de super expressão do gene GA 2-oxidase de kenaf, a célula vegetal sendo transformada com um vetor de expressão que compreende uma molécula de ácido nucléico isolada que compreende a seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 1 que codifica uma GA 2-oxidase de kenaf, ou uma fita complementar ou uma seqüência homóloga da mesma, onde a seqüência homóloga é dotada de uma identidade de seqüência de pelo menos 80% para SEQ ID NO: 1. De acordo com algumas modalidades, a seqüência homóloga dentro do vetor de expressão é dotada de uma identidade de seqüência de pelo menos 90%, alternativamente de pelo menos 95%, alternativamente de 100% para SEQ ID NO: 1. De acordo com uma determinada modalidade, a célula vegetal é

transformada com um vetor de expressão que compreende uma molécula de ácido nucléico isolada que compreende a seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 1, que codifica uma GA 2-oxidase de kenaf. De acordo com uma modalidade, a célula vegetal é uma célula vegetal de kenaf.

5 De acordo com um aspecto adicional, a presente invenção proporciona uma planta transgênica que compreende pelo menos uma célula vegetal transformada com um vetor de expressão que compreende uma molécula de ácido nucléico isolada que compreende a seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 1 que codifica uma GA 2-oxidase de kenaf, ou uma fita complementar ou uma seqüência homóloga da
10 mesma, onde a seqüência homóloga é dotada de uma identidade de seqüência de pelo menos 80% para SEQ ID NO: 1. De acordo com algumas modalidades, a seqüência homóloga é dotada de uma identidade de seqüência de pelo menos 90%, alternativamente de pelo menos 95%, alternativamente de 100% para SEQ ID NO: 1. De acordo com uma determinada modalidade, a planta transgênica compreende pelo menos uma célula vegetal
15 transformada com um vetor de expressão que compreende uma molécula de ácido nucléico isolada que compreende a seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 1 que codifica uma GA 2-oxidase de kenaf. De acordo com uma modalidade, a planta transgênica é uma planta de kenaf.

De acordo com outro aspecto, a presente invenção proporciona um método para
20 produzir uma planta transgênica dotada de super expressão da GA 2-oxidase de kenaf, o método compreende introduzir em pelo menos uma célula da planta um vetor de expressão que compreende uma molécula de ácido nucléico isolada que compreende a seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 1 que codifica uma GA 2-oxidase de kenaf, ou uma fita complementar ou uma seqüência homóloga da mesma, onde a seqüência
25 homóloga é dotada de uma identidade de seqüência de pelo menos 80%, alternativamente de pelo menos 90%, alternativamente de pelo menos 95%, alternativamente de 100% para SEQ ID NO: 1, deste modo produzindo uma planta transgênica dotada de níveis mais baixos da gibberellin (GA) do que uma planta não transgênica. De acordo com uma determinada modalidade, o método para produzir uma planta transgênica compreende a etapa de introduzir em pelo menos uma célula um vetor de expressão que compreende
30 de uma molécula de ácido nucléico isolada que compreende a seqüência de nucleotídeo como determinado na SEQ ID NO: 1 que codifica uma GA 2-oxidase de kenaf. De acordo com uma modalidade, a planta transgênica é uma planta de kenaf.

35 As referidas e outras modalidades da presente invenção serão melhor entendidas com relação às figuras, descrição, exemplos e reivindicações a seguir.

Breve Descrição das Figuras

As figuras 1A-B mostram fotografias de plantas *Arabidopsis* desenvolvidas sob

condições de dia longo ou dia curto. A FIGURA 1A mostra *Arabidopsis* plantas desenvolvidas sob condições de dia longo; Esquerda: tipo selvagem (wt) controle; meio: GA 20-Oxidase de planta super expressa transgênica; direita: GA 2-Oxidase de planta transgênica silenciada. A FIGURA 1B mostra plantas *Arabidopsis* desenvolvidas sob condições de dia curto. Esquerda: wt controle; direita: GA 20-Oxidase transgênicas super expressa *Arabidopsis*.

A FIGURA 2 mostra seções transversais do caule de plantas do tipo selvagem e plantas *Arabidopsis* transgênicas. Nas plantas transgênicas super expressas com GA 2-oxidase um aumento no número de células de fibra nos feixes vasculares e entre os feixes foi observado assim como uma reduzida lignificação das paredes celulares das fibras.

A FIGURA 3 mostra uma fotografia das plantas de tabaco. A planta de tabaco do tipo selvagem e a GA 20-oxidase super expressa transgênica são mostradas.

As figuras 4A-C mostram seções transversais do caule das plantas de tipo selvagem e transgênicas GA 20-oxidase. As ilhas de floema interno das Plantas que super expressam GA-20 oxidase contêm fibras (figuras 4A e 4B) as quais não foram observadas nos internódios de plantas wt (figura 4C).

As figuras 5A-C mostram fotografias de plantas do tipo selvagem e de tabaco com GA 2-oxidase silenciada. Esquerda: plantas transgênicas com GA 2-oxidase silenciada; direita: plantas do tipo selvagem. As plantas transgênicas GA 2-oxidase silenciadas são mais longas do que as plantas do tipo selvagem.

As figuras 6A-B mostram uma comparação entre a linhagem da GA 2-Oxidase silenciada com relação ao controle wt. A FIGURA 6A mostra uma comparação do número médio de internódios, comprimento médio da filha mais longa e as alturas médias da linhagem da GA 2-Oxidase silenciada com relação ao controle wt. A FIGURA 6B mostra as alturas média, mais curta e mais longa (cm) para cada planta GA 2-Oxidase silenciada e planta wt.

A FIGURA 7 mostra a seqüência genômica da GA 2-oxidase de kenaf.

A FIGURA 8 mostra a seqüência de nucleotídeo do cDNA que codifica a GA 2-oxidase de kenaf e a seqüência de amino ácido da enzima.

Descrição Detalhada das Modalidades Preferidas

Definições

O termo "gene" se refere a DNA de cromossomo, DNA de plasmídeo, cDNA, DNA sintético, ou outro DNA que codifica um peptídeo, polipeptídeo, proteína, ou Moléculas de RNA, e regiões que margeiam a seqüência de codificação envolvida na regulação da expressão.

O termo "ácido nucléico" se refere a ácido deoxiribonucleico (DNA) e ácido ribo-

nucléico (RNA). O ácido nucléico pode ser simples, duplo, ou de múltiplas fitas e pode compreender nucleotídeos modificados ou não modificados.

O termo “planta” é usado aqui em seu sentido mais amplo. O mesmo inclui, mas não é limitado a, quaisquer espécies de planta lenhosa, herbácea, perene ou anual. O mesmo também se refere a uma pluralidade de células de plantas que são largamente diferenciadas em uma estrutura que está presente em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. As referidas estruturas incluem, mas não são limitadas a, uma raiz, caule, broto, folha, flor, pétalas, fruto, etc.

O termo “hibridização” se refere à capacidade de uma fita de ácido nucléico se unir com uma fita complementar por meio de pareamento de base. A hibridização ocorre quando seqüências complementares nas duas fitas de ácido nucléico se ligam entre si.

Como usado aqui, o termo “homologia” quando usado em relação a seqüências de ácido nucléico se refere a um grau de similaridade ou identidade entre pelo menos duas seqüências de nucleotídeos. Pode haver homologia parcial ou homologia completa (isto é, identidade). “Identidade de seqüência” se refere a uma medida de relatividade entre duas ou mais seqüências de nucleotídeos, expressas como um percentual com referência ao comprimento de comparação total. O cálculo de identidade leva em consideração os resíduos de nucleotídeo que são idênticos e nas mesmas posições relativas em suas seqüências respectivas. Um espaço, isto é uma posição em um alinhamento onde um resíduo está presente em uma seqüência mas não na outra como uma posição sem resíduos idênticos. Um programa de computador amplamente utilizado e aceito para a realização do alinhamento de seqüências é o CLUSTALW vl. 6 (Thompson, et al. Nucl. Acids Res., 22: 4673 - 4680, 1994). De modo similar, o termo “homologia” quando usado em relação a seqüências de proteína se refere a um grau de similaridade ou identidade entre pelo menos duas seqüências de proteína. Pode haver homologia parcial ou homologia completa (isto é, identidade).

O termo “promotor” ou “região promotora” se refere a uma seqüência de ácido nucléico, em geral encontrada a montante (5') a uma seqüência de codificação que controla a expressão de uma seqüência de codificação ao controlar a produção do RNA mensageiro (mRNA) ao proporcionar o campo de reconhecimento para RNA polimerase e/ou outros fatores necessários para dar início à transcrição no campo correto. Como contemplado aqui, um promotor ou região promotora inclui variações de promotores derivados por meio de ligação a diversas seqüências regulatórias, aleatórias ou de mutagênese controlada, e a adição ou duplicação de seqüências intensificadoras. A região promotora descrita aqui, e as equivalentes biologicamente funcionais da mesma, são responsáveis por direcionar a transcrição das seqüências de codificação sob o controle da mesma quando introduzida no hospedeiro como uma parte de um vetor recombinante adequado, como demonstrado

por sua habilidade em produzir mRNA.

O termo “construtor de DNA” ou “vetor de expressão” se refere a qualquer agente tal como um plasmídeo, cosmídeo, vírus, seqüência de replicação autônoma, fago, ou seqüência de nucleotídeo de DNA ou RNA de fita simples ou de fita dupla linear ou circular, derivados de qualquer fonte, capazes de integração genômica ou replicação autônoma, que compreende uma molécula de DNA na qual uma ou mais seqüências de DNA estiveram ligadas em um modo de funcionalidade operacional. O referido construtor de DNAs ou vetores são capazes de introduzir uma seqüência reguladora 5’ ou região promotora e uma seqüência de DNA para um produto de gene selecionado em uma célula de tal modo que a seqüência de DNA é transcrita em um mRNA funcional que é traduzido e portanto expresso. Construtor de DNAs ou vetores de expressão podem ser construídos para serem capazes de expressar RNA de dupla fita ou RNAs antisentido de modo a inibir a translação de um RNA específico de interesse.

O termo “gene heterólogo” se refere a um gene que codifica um polipeptídeo ou proteína que não está em seu ambiente natural (isto é, foi alterada pelas mãos do homem). Por exemplo, um gene heterólogo inclui um gene de uma espécie introduzido em outra espécie. Um gene heterólogo ainda inclui um gene nativo a um organismo que foi alterado de alguma maneira (por exemplo, mutante, adicionado em múltiplas cópias, ligado a um promotor não nativo ou seqüência de intensificação, etc.). Genes heterólogos podem compreender seqüências de genes de planta que compreendem formas de cDNA de um gene de planta; as seqüências de cDNA podem ser expressas em qualquer sentido (para produzir mRNA) ou orientação antisentido (para produzir uma transcrição de RNA antisentido que é complementar à transcrição de mRNA).

O termo “transgênica” quando usado com referência a uma planta ou fruto ou semente (isto é, uma “planta transgênica” ou “fruto transgênico” ou uma “semente transgênica”) se refere a uma planta ou fruto ou semente que contém pelo menos um gene heterólogo em uma ou mais de suas células.

O termo “oligonucleotídeo antisentido” se refere a um oligonucleotídeo que se liga ao RNA alvo por meio de interações de RNA-RNA ou RNA-DNA ou RNA-PNA (proteína ácido nucléico) e altera a atividade do RNA alvo (para uma revisão, ver Stein e Cheng, 1993 Science 261, 1004). Tipicamente, moléculas antisentido são complementares a uma seqüência alvo junto de uma única seqüência contígua da molécula antisentido. Entretanto, em determinadas modalidades, o oligonucleotídeo antisentido pode ser complementar a duas (ou mesmo mais) seqüências alvo não contíguas.

O termo “transformação” se refere a um processo de introduzir uma seqüência de ácido nucléico exógena (por exemplo, um vetor, vetor de expressão) em uma célula ou protoplasto na qual o ácido nucléico exógeno é incorporado em um cromossomo ou é capaz de

replicação autônoma.

O termo “regeneração” se refere ao processo de desenvolver uma planta a partir de uma célula vegetal (por exemplo, protoplasto de planta ou explante).

O termo “a expressão de gene” se refere ao processo de converter informação genética codificada em um gene em RNA (por exemplo, mRNA, rRNA, tRNA, ou snRNA) através de “transcrição” do gene (isto é, por meio da ação enzimática de uma polimerase de RNA), e em proteína, através de “tradução” de mRNA. A expressão de gene pode ser regulada em muitos estágios no processo. “Regulação a maior” ou “ativação” se refere à regulação que aumenta a produção da expressão de produtos de gene (isto é, RNA ou proteína), enquanto “regulação a menor” ou “repressão” se refere à regulação que diminui a produção da expressão de produtos de gene (isto é, RNA ou proteína). Moléculas (por exemplo, fatores de transcrição) que estão envolvidos na regulação a maior ou regulação a menor são com freqüência chamados de “ativadores” e “repressores,” respectivamente.

O termo “fragmento” se refere a um polinucleotídeo ou polipeptídeo que é uma porção de uma molécula de comprimento total de ácido nucléico ou uma proteína de comprimento total, respectivamente.

O termo “análogo” como usado aqui se refere a uma proteína que compreende seqüências alteradas da GA 2-oxidase de kenaf de SEQ ID NO: 2 por substituições, adições, ou modificações químicas de amino ácido. Ao se usar “substituições de amino ácidos”, se quer dizer que resíduos de amino ácido funcionalmente equivalentes são substituídos por resíduos dentro de uma seqüência resultando em uma mudança silenciosa. Por exemplo, um ou mais resíduos de amino ácido dentro de uma seqüência pode ser substituído por outro amino ácido de polaridade similar, que atua como um equivalente funcional, resultando em uma alteração silenciosa. As referidas substituições são conhecidas como substituições conservadoras. Adicionalmente, uma substituição não conservadora pode ser produzida em um amino ácido desde que a atividade enzimática do análogo seja preservada se comparada à atividade de uma GA 2-oxidase intacta de kenaf.

A presente invenção proporciona o cDNA e a seqüência de amino ácido da GA 2-oxidase de kenaf como determinado na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 (figura 8). A presente invenção adicionalmente proporciona uma seqüência genômica da GA 2-oxidase de kenaf como determinado na SEQ ID NO: 3 (figura 7) e uma seqüência de DNA para silenciar a Expressão de GA 2-oxidase como determinado na SEQ ID NO: 4.

A presente invenção proporciona um construtor de DNA ou um vetor de expressão que compreende um ácido nucléico de interesse o qual pode adicionalmente compreender um promotor de planta.

Uma série de promotores que são ativos nas células de plantas foi descrito

na literatura. Os referidos incluem o promotor de sintase de nopalina (NOS) (Ebert et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 5745 - 5749, 1987), o promotor de sintase de octopina (OCS), os promotores de caulimovirus tais como o promotor do vírus mosaico de couve flor (CaMV) 19S (Lawton et al., Planta Mol. Biol. 9: 315 - 324, 1987) e o promotor CaMV 35S (Odell et al., Nature 313: 810 - 812, 1985), o promotor 35S do vírus mosaico da escrofulária; o promotor induzível a luz a partir da pequena subunidade da ribulose-1,5-bis-fosfato carboxilase (ssRUBISCO), o promotor Adh (Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 6624 - 6628, 1987), o promotor de sintase de sucrose (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 4144 - 4148, 1990), o promotor do complexo do R gene (Chandler et al., The Plant Cell 1: 1175 - 1183, 1989), e o promotor do gene da proteína de ligação clorofilaa β , e semelhante. Os referidos promotores têm sido usados para criar o construtor de DNAs que foram expressos em plantas.

Para o objetivo de expressão em fontes de tecidos de plantas, tal como a folha, semente, raiz ou caule, é preferido que os promotores utilizados na presente invenção sejam dotados de uma expressão relativamente alta nos referidos tecidos específicos. Para este fim, se pode escolher a partir de uma série de promotores para genes com expressão específica para tecido- ou célula- ou expressão intensificada. Exemplos dos referidos promotores reportados na literatura incluem o promotor GS2 de sintetase de glutamina cloroplasto da ervilha (Edwards et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 3459 - 3463, 1990), o promotor de frutose-1,6-bifosfatase de cloroplasto (FBPase) do trigo (Lloyd et al., Mol. Gen. Genet. 225: 209 - 216, 1991), o promotor fotossintético nuclear ST-LS1 da batata (Stockhaus et al., EMBO J. 8: 2445 - 2451, 1989), o promotor de serina/treonina quinase (PAL) e o promotor de glicoamilase (CHS) da *Arabidopsis thaliana*.

A expressão de promotores específicos pode ser monitorada pelo uso de um gene reportador tal como P-glucuronidase (Jefferson et al., EMBO J. 6: 3901 - 3907, 1987), luciferase (LUC, Ow et al., Science 234: 856 - 859, 1986), proteína fluorescente verde (GFP, Sheen et al., Planta J. 8: 777 - 784, 1995) ou qualquer outro gene reportador clonado a jusante ao promotor e transitória ou estavelmente transformado em células de plantas. A detecção da atividade do gene reportador é indicadora de atividade de transcrição de um promotor dentro do tecido.

O construtor de DNAs ou vetores pode também incluir com a região de codificação de interesse uma sequência de ácido nucléico que atua, no total ou em parte, para terminar a transcrição daquela região. Por exemplo, as referidas seqüências foram isoladas incluindo a sequência Tr7 3' e a sequência NOS 3' (Ingelbrecht et al., The Plant Cell 1: 671 - 680, 1989; Bevan et al., Nucleic Acids Res. 11: 369 - 385, 1983), ou semelhante.

O construtor de DNAs ou vetores pode também incluir elementos regulatórios. Exemplos dos referidos incluem o íntron Adh 1 (Callis et al., Genes e Develop. 1: 1183 -

1200, 1987), o íntrons da sintase de sucrose (Vasil et al., Plant Physiol. 91: 1575 - 1579, 1989), primeiro íntron do gene hsp70 do milho (Patente US No. 5,362,865), e o elemento TMV omega (Gallie et al., The Cell Plant 1: 301 - 311, 1989). Os referidos e outros elementos regulatórios podem ser incluídos quando apropriado.

5 O construtor de DNAs ou vetores pode também incluir um marcador selecionável. Marcadores selecionáveis podem ser usados para selecionar plantas ou células de plantas que contêm o material genético exógeno. Exemplos dos referidos incluem um neo gene (Potrykus et al., Mol. Gen. Genet. 199: 183 - 188, 1985) que codifica a resistência a canamicina e pode ser selecionado para usar canamicina, G418; um gene de bastão
10 que codifica resistência à bialaphos; um gene mutante de sintase EPSP que codifica resistência a glifosato; um gene nitrilase o qual confere resistência a bromoxinil (Stalker et al., J. Biol. Chem. 263: 6310 - 6314, 1988); e um gene DHFR de resistência a metotrexato (Thillet et al., J. Biol. Chem. 263: 12500 - 12508, 1988).

O construtor de DNA ou vetor de expressão pode também incluir intensificadores de tradução. O construtor de DNA pode conter uma ou mais seqüências líderes não traduzidas 5' que podem servir para aumentar a expressão dos produtos de gene a partir de uma transcrição de mRNA resultante. As referidas seqüências podem ser obtidas a partir de RNAs virais, a partir de genes eucarióticos adequados, ou a partir de uma seqüência de genes sintéticos, e semelhante.

20 Transformação de Planta

O construtor de DNA da presente invenção pode ser utilizado para estável ou transitoriamente transformar células de plantas. Na transformação estável, a molécula de ácido nucléico é integrada em um genoma de planta, e como tal o mesmo representa um traço estável e herdado. Na transformação transitória, a molécula de ácido nucléico é expressa pela célula transformada mas não é integrada no genoma, e como tal representa
25 um traço transitório.

Os métodos principais da integração estável do DNA exógeno no DNA genômico da planta incluem: (i) Transferência de gene mediada a Agrobacterium (ver, por exemplo, Klee et al., (1987). Annu Rev Plant Physiol 38, 467 - 486; e Gatenby, A. A. Plant Biotechnology, pp. 93 - 112 (1989) S. Kung e C. J. Arntzen, eds., Butterworth Publishers, Boston,
30 Mass); e (ii) transferência direta de DNA inclui microinjeção, eletroporação, e bombardeio de microprojétil (U.S. 6,723,897 e referências na mesma, a qual se encontra aqui incorporada por referência em sua totalidade).

Transferência mediada a Agrobacterium é um sistema amplamente aplicável para
35 introduzir genes em células de plantas pelo fato de que o DNA pode ser introduzido em tecidos de planta total, deste modo contornando a necessidade de regeneração de uma planta intacta a partir de um protoplasto. O sistema mediado a Agrobacterium in-

clui o uso de vetores de plasmídeo que contêm segmentos de DNA que se integram em um DNA genômico de planta. Métodos de inoculação de tecido de planta variam dependendo das espécies de planta e do sistema de envio de *Agrobacterium*. Uma abordagem amplamente usada é o procedimento de disco de filha, que pode ser realizado com qualquer explante de tecido que proporciona uma boa fonte para iniciar a diferenciação de planta total. Uma abordagem suplementar emprega o sistema de envio de *Agrobacterium* em combinação com infiltração de vácuo. O sistema de *Agrobacterium* é em especial útil para a criação de plantas dicotiledônias transgênicas.

Em eletroporação, os protoplastos são brevemente expostos a um forte campo elétrico, abrindo mini-poros para permitir que o DNA entre. Em microinjeção, o DNA é mecanicamente injetado diretamente nas células usando micropipetas. Em bombardeio de micropartículas, o DNA é adsorvido em microprojéteis tal como cristais de sulfato de magnésio ou partículas de tungstênio, e os microprojéteis são fisicamente acelerados em células ou tecidos de planta.

Em seguida da transformação estável, a propagação da planta então ocorre. O método mais comum de propagação de planta é por semente. A desvantagem da regeneração por propagação por semente, entretanto, é a falta de uniformidade na colheita em virtude de heterozigosidade, uma vez que sementes são produzidas por plantas de acordo com as variações genéticas governadas por regras de Mendelian. Em outras palavras, cada semente é geneticamente diferente e cada uma irá se desenvolver com seus traços específicos. Portanto, é preferido que a regeneração seja efetuada de modo que a planta regenerada é dotada de traços idênticos e características daquelas da planta transgênica parente. O método preferido de regenerar a planta transformada é por micropropagação, que proporciona uma reprodução rápida e consistente da plantas transformadas.

A micropropagação é um processo de desenvolvimento de plantas de segunda geração a partir de uma única amostra de tecido seccionada a partir de uma planta parente selecionada ou cultivar. O referido processo permite a reprodução em massa de plantas dotadas de tecido preferido e que expressam uma proteína de fusão. As plantas recentemente geradas são geneticamente idênticas, e são dotadas de todas as características, da planta original. A micropropagação permite a produção em massa de material de planta de qualidade em um curto período de tempo e oferece rápida multiplicação dos cultivares selecionados com a preservação das características da planta original transgênica ou planta transformada. As vantagens do referido método de clonagem de planta incluem a velocidade de multiplicação da planta e a qualidade e a uniformidade da plantas produzida.

A micropropagação é um procedimento de múltiplos estágios que requer a altera-

ção do meio de cultura ou das condições de desenvolvimento entre os estágios. O processo de micropropagação envolve quatro estágios básicos: estágio um, cultura inicial do tecido; estágio dois, multiplicação da cultura de tecido; estágio três, diferenciação e formação da planta; e estágio quatro, cultivo em estufa e fortalecimento. Durante o estágio um, a cultura de tecido é estabelecida e certificada como livre de contaminantes. Durante o estágio dois, a cultura de tecido inicial é multiplicada até que um número suficiente de amostras de tecido seja produzido para ir de encontro aos objetivos da produção. Durante o estágio três, as amostras de tecido recentemente desenvolvidas são divididas e divididas em plantinhas individuais. No estágio quatro, as plantinhas transformadas são transferidas a uma estufa para fortalecimento onde a tolerância da planta à luz é gradualmente aumentada de modo que as mesmas podem continuar a se desenvolver em ambiente natural.

Embora a transformação estável seja atualmente preferida, a transformação transitória, por exemplo, de células de folha, células meristemáticas, ou a planta total é também previsto pela presente invenção.

A transformação transitória pode ser efetuada por qualquer um dos métodos de transferência de DNA descritos acima por infecção viral usando vírus de planta modificada.

Vírus que foram mostrados como úteis para a transformação dos hospedeiros de planta incluem vírus mosaico da couve-flor (CaMV), vírus mosaico do tabaco (TMV), e baculovírus (BV).

A transformação de plantas usando vírus de planta é descrita, por exemplo, em *Communications in Molecular Biology: Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 172 - 189.

A construção de vírus de RNA de planta para a introdução e expressão de seqüências exógenas não virais de ácido nucléico em plantas é conhecida na técnica e demonstrada pelas referências acima assim como por Dawson et al. (1989) *Virology* 172, 285 - 292.

Se o vírus de transformação for um vírus de DNA, aquele versado na técnica pode implementar modificações adequadas ao vírus em si. Alternativamente, o vírus pode primeiro ser clonado em um plasmídeo bacteriano para facilidade de construção do vetor viral desejado com o DNA estranho. O vírus pode então ser removido do plasmídeo. Se o vírus é um vírus de DNA, a origem bacteriana de replicação pode ser fixada ao DNA viral, o qual é então replicado pela bactéria. A transcrição e a tradução do DNA produzirá a proteína de revestimento, a qual irá encapsular o DNA viral. Se o vírus for um Vírus de RNA, o vírus é em geral clonado como um cDNA e inserido em um plasmídeo. O plasmídeo é então usado para produzir todos os genes dos construtores genéticos da planta. O vírus de RNA é então transcrito a partir da seqüência viral do plasmídeo, seguido da tradução dos genes virais para produzir as proteínas de revestimento as quais encapsulam o

RNA viral.

A transformação do protoplasto de plantas foi reportada usando métodos com base em precipitação de fosfato de cálcio, tratamento com polietileno glicol, eletroporação, e combinações dos referidos tratamentos (ver, por exemplo, Marcotte et al., Nature 335: 454 - 457, 1988).

A regeneração, desenvolvimento, e cultivo de plantas a partir de protoplastos de planta transformantes simples ou a partir de diversos explantes transformados são bem conhecidos na técnica. A referida regeneração e processo de desenvolvimento tipicamente incluem as etapas de seleção das células transformadas, cultivar as referidas células individualizadas através dos estágios usuais de desenvolvimento embriogênico através do estágio de platinhas desenvolvidas. Embriões e sementes transgênicas são similarmente regenerados. Os brotos enraizados transgênicos resultantes são posteriormente plantados em um meio apropriado para o desenvolvimento da planta tal como solo.

O desenvolvimento ou regeneração de plantas que contêm o gene estranho exógeno que codifica a proteína de interesse é bem conhecido na técnica. Preferivelmente, as plantas regeneradas são auto-polinizadas para proporcionar plantas transgênicas homozigóticas. De outro modo, o pólen obtido a partir de plantas regeneradas é cruzado com plantas desenvolvidas por semente de linhagens agronomicamente importantes.

De modo oposto, o pólen de plantas das referidas linhagens importantes é usado para polinizar as plantas regeneradas. Uma planta transgênica da presente invenção que contém um polipeptídeo desejado é cultivado usando métodos bem conhecidos daqueles versados na técnica.

Silenciamento da expressão de GA 2-oxidase

O silenciamento da GA 2-oxidase pode ser efetuado a nível genômico e/ou de transcrição usando uma variedade de moléculas que interferem com a transcrição e/ou a tradução (por exemplo, antisentido, siRNA, Ribozima, ou DNazima).

Um agente capaz de regular a menor ou silenciar a GA 2-oxidase é uma molécula de RNA de pequena interferência (siRNA) no processo de RNA de interferência (RNAi). RNAi é um processo de duas etapas. Na primeira, a etapa de iniciação, entrada de dupla fita (dsRNA) é digerida em RNAs de pequena interferência de 21- a 23-nucleotídeos (nt) (siRNAs), provavelmente pela ação de Dicer, um membro da família de RNase III de ribonucleases dsRNA-específicas, cujos processos (clivam) dsRNA (introduzido diretamente ou por meio de um transgene ou um vírus) em um modo ATP-dependente. Eventos de clivagens sucessivas degradam o RNA para 19- a 21-bp duplexes (o siRNA), cada um com 2-nucleotídeo 3' projeções.

Na segunda etapa, denominada de etapa executora, os duplexes de siRNA se ligam a um complexo de nuclease para formar o complexo de silenciamento RNA-induzido

(RISC). Um desenrolamento ATP-dependente do duplex de siRNA é necessário para a ativação do RISC. O RISC ativo então direciona a transcrição homóloga por interações de pareamento de base e cliva o mRNA em fragmentos de 12-nucleotídeos a partir da terminação 3' do siRNA. Embora o mecanismo de clivagem se encontre ainda a ser elucidado, as pesquisas indicam que cada RISC contém um único siRNA e uma RNase.

Em virtude da potência notável do RNAi, uma etapa de amplificação dentro do trajeto do RNAi foi sugerida. A amplificação pode ocorrer ao se copiar as entradas de ds-RNAs para gerar mais siRNAs, ou por replicação dos siRNAs formados. Alternativa ou adicionalmente, a amplificação pode ser realizada por múltiplos eventos de renovação de RISC. Para mais informação sobre RNAi, ver as revisões a seguir: Cullen, B. R. (2002). RNA interference: antiviral defense and genetic tool. *Nat Immunol* 3, 597 - 599; e Brand, S. (2002). Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta* 1575, 15 - 25.

A síntese das moléculas de RNAi adequada para uso com a presente invenção pode ser afetada como a seguir. Primeiro, uma seqüência de mRNA de GA 2-oxidase é escaneada a jusante do códon de partida AUG para seqüência de dinucleotídeos-AA. A ocorrência de cada AA e os 19 3'- nucleotídeos adjacentes é registrada como um campo alvo potencial de siRNA. Preferivelmente, campo salvo de siRNA são selecionados a partir da estrutura de leitura aberta (ORF), na medida em que as regiões não traduzidas (UTRs) são mais ricas em campos de ligação de proteína regulatória. As proteínas de ligação a UTR e/ou complexos de início de tradução podem interferir com a ligação do complexo de endonuclease de siRNA (Tuschl (2001)). Será observado, entretanto, que os siRNAs direcionados a regiões não traduzidas podem também ser eficazes, como demonstrado para GAPDH, onde o siRNA direcionou o 5' UTR mediado sobre uma redução de 90% em mRNA GAPDH celular e aboliu completamente os níveis de proteína.

Segundo, campo salvo potenciais são comparados a uma base de dados genômica apropriada usando qualquer programa de alinhamento de seqüência, tal como o programa BlastN oferecido pelo servidor NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Campos alvo putativos que exibem significante homologia a outras seqüências de codificação são filtrados.

Seqüências alvo qualificadas são selecionadas como modelos para a síntese de siRNA. Seqüências preferidas são aquelas que incluem baixo teor de G/C, na medida em que os mesmos provaram ser mais eficazes na mediação do silenciamento de gene em comparação com seqüências incluindo um teor de G/C superior a 55%. Diversos campos alvo são preferivelmente selecionados ao longo do comprimento do gene alvo para avaliação. Para melhor avaliação dos siRNAs selecionados, um controle negativo é preferivelmente usado em conjunto. siRNAs de controle negativo preferivelmente incluem a mesma composição de nucleotídeo que a dos siRNAs mas são desprovidas de homologia signifi-

cante para o genoma. Assim, uma seqüência de nucleotídeo espalhada do siRNA é preferivelmente usada, desde que a mesma não exiba qualquer homologia significativa para qualquer outro gene.

A presente invenção proporciona um construtor de DNA projetado para gerar siRNAs direcionados a uma GA 2-oxidase de kenaf. De acordo com uma modalidade, o construtor de DNA compreende:

(a) pelo menos um promotor de planta operacionalmente ligado a;

(b) uma seqüência de polinucleotídeo que codifica uma seqüência de RNA que forma um RNA de dupla fita, onde a seqüência de polinucleotídeo compreende uma primeira seqüência de nucleotídeo de pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de seqüência à seqüência de sentido de nucleotídeo de uma GA 2-oxidase ou um fragmento da mesma, e uma segunda seqüência de nucleotídeo de pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de seqüência para uma seqüência complementar da seqüência de sentido de nucleotídeo da referida GA 2-oxidase ou um fragmento da mesma; e opcionalmente

(c) um sinal de terminação de transcrição.

De acordo com algumas modalidades, o construtor de DNA de acordo com a presente invenção é projetado para expressar um RNA de caule-alça, que compreende além da primeira (sentido) e da segunda (antisentido) seqüência de nucleotídeos uma seqüência de polinucleotídeo espaçadora, localizada entre a região de DNA que codifica a primeira e a segunda seqüência de nucleotídeos. O comprimento da seqüência de polinucleotídeo espaçadora pode variar de acordo com a estrutura específica do RNA de caule-alça. Tipicamente, a proporção do comprimento espaçador para o comprimento das primeira e segunda seqüências de nucleotídeos é na faixa de 1:5 a 1:10.

De acordo com outra modalidade, o construtor de DNA projetado para gerar siRNAs direcionados a uma GA 2-oxidase de kenaf compreende:

(a) pelo menos um promotor de planta operacionalmente ligado a;

(b) uma seqüência de polinucleotídeo que codifica uma seqüência de RNA que forma um RNA de dupla fita na forma de caule-alça, onde o RNA de dupla fita compreende uma primeira seqüência de nucleotídeo de pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de seqüência a seqüência de sentido de nucleotídeo de uma GA 2-oxidase ou um fragmento da mesma; uma segunda seqüência de nucleotídeo de pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% identidade para uma seqüência complementar da seqüência de sentido de nucleotídeo de uma GA 2-oxidase ou um fragmento da mesma;

(c) uma seqüência espaçadora que conecta as primeira e segunda seqüências de nucleotídeo; e opcionalmente,

(d) um sinal de terminação de transcrição.

De acordo com uma modalidade, o espaçador compreende uma sequência de nucleotídeos derivada de um gene íntron conhecido na técnica por aumentar a produção de siRNAs.

5 As primeira e segunda sequências de nucleotídeos do RNA de dupla fita da presente invenção podem ser um fragmento do gene GA 2-oxidase, podem ser um gene de comprimento total, a não-região de codificação ou parte do mesmo ou uma combinação dos mesmos.

10 Como usado aqui, a sequência de nucleotídeo das moléculas de RNA pode ser identificada por referência a uma Sequência de nucleotídeo de DNA da listagem de sequência. Entretanto, aqueles versados na técnica entenderão se quer se dizer RNA ou DNA é dependendo do contexto. Ademais, a sequência de nucleotídeo é idêntica exceto em que a base T é substituída por uracila (U) nas moléculas de RNA.

15 De acordo com determinadas modalidades, o construtor de DNA projetado para gerar siRNAs direcionadas a uma GA 2-oxidase ou um fragmento da mesma, o comprimento da segunda (antisentido) sequência de nucleotídeo do construtor de DNA é amplamente determinada pelo comprimento da primeira (sentido) sequência de nucleotídeo, e pode corresponder ao comprimento da última sequência.

20 Entretanto, é possível se usar sequências antisentido que diferem de comprimento em cerca de 10%.

A primeira e a segunda sequência de nucleotídeos do construtor de DNA projetado para gerar siRNAs pode ser de qualquer comprimento proporcionando uma sequência que compreende pelo menos 20 nucleotídeos contíguos. Assim, a primeira e a segunda sequência de nucleotídeos pode compreender um fragmento do gene GA 2-oxidase ou um comprimento total do gene GA 2-oxidase. De acordo com algumas modalidades, o comprimento da sequência de nucleotídeos é de 20 nucleotídeos ao 1,200 nucleotídeos.

30 De acordo com uma modalidade, os siRNAs gerados pelo construtor de DNA da presente invenção são direcionados a silenciar um fragmento do gene GA 2-oxidase, incluindo a região de codificação para GA 2-oxidase.

De acordo com uma modalidade preferida, a primeira sequência de nucleotídeo compreende a sequência de nucleotídeo dotado de 90% de identidade, adequadamente 95% ou 100% de identidade a uma sequência de nucleotídeo determinada em SEQ ID NO: 1 ou um fragmento da mesma. De acordo com uma determinada modalidade, a primeira sequência de nucleotídeo consiste da sequência como determinado na SEQ ID NO: 4.

De acordo com outra modalidade preferida, a segunda sequência de nucleotídeo

compreende uma seqüência de nucleotídeo dotado de 90% de identidade, adequadamente 95% ou 100% de identidade para a fita complementar da molécula de ácido nucleico determinada em SEQ ID NO: 1 ou um fragmento da mesma. De acordo com uma determinada modalidade, a segunda seqüência de nucleotídeo é complementar a uma seqüência determinada em SEQ ID NO: 4.

De acordo com determinadas modalidades, a primeira e a segunda seqüência de nucleotídeos são operacionalmente ligadas ao mesmo promotor. As fitas transcritas, as quais são pelo menos parcialmente complementares, são capazes de formar dsRNA. De acordo com outras modalidades, a primeira e a segunda seqüência de nucleotídeos são transcritas como duas fitas separadas. Quando o dsRNA é assim produzido, a seqüência de DNA a ser transcrita é ladeada por dois promotores, um controlando a transcrição de uma primeira seqüência de nucleotídeo, e o outro controlando a transcrição da segunda, seqüência de nucleotídeo complementar. Os referidos dois promotores podem ser idênticos ou diferentes. De acordo com uma modalidade, a primeira e a segunda seqüência de nucleotídeos são operacionalmente ligadas ao mesmo promotor.

Outro agente capaz de silenciar uma GA 2-oxidase é uma molécula de DNAzima, que é capaz de especificamente clivar uma transcrição de mRNA ou uma seqüência de DNA de uma GA 2-oxidase.

DNAzimas são polinucleotídeos de fita simples que são capazes de clivar tanto seqüências alvo de fita simples como de fita dupla (Breaker et al. (1995) Curr Biol 2, 655 - 660; Santoro et al., (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94, 4262 - 4266). Um modelo geral (o modelo "10-23") para uma DNAzima foi proposto. DNAzimas "10-23" apresentam um domínio catalítico de 15 deoxiribonucleotídeos, ladeados por dois domínios de reconhecimento de substrato de sete a nove deoxiribonucleotídeos cada. Este tipo de DNAzima pode efetivamente clivar o seu RNA de substrato nas junções de purina:pirimidina (para revisão de DNAzimas, ver: Khachigian (2002) Curr Opin Mol Ther 4, 119 - 121).

Exemplos de construção e amplificação de DNAzimas sintéticas e trabalhadas por engenharia que reconhecem campos de clivagem alvo de uma fita e dupla fita são descritos na Patente US No. 6,326,174 para Joyce et al.

O silenciamento de uma GA 2-oxidase pode também ser afetado pelo uso de um oligonucleotídeo antisentido capaz de especificamente hibridizar com uma transcrição de mRNA que codifica uma GA 2-oxidase.

Deve ser entendido que algoritmos estão disponíveis para identificar as referidas seqüências com a mais alta afinidade de ligação prevista para seus mRNA alvo com base em um ciclo termodinâmico que é responsável pela energética das alterações estruturais tanto no mRNA alvo como no oligonucleotídeo (ver, por exemplo, Walton et al. (1999) Biotechnol Bioeng 65, 1 - 9). Adicionalmente, diversas abordagens para projetar e prever

eficiências de oligonucleotídeos específicos usando um sistema in vitro foram também publicadas (Matveeva et al. (1998). *Nature Biotechnology* 16, 1374 - 1375).

Assim, o consenso atual é que desenvolvimentos recentes no campo da tecnologia antisentido, a qual, como descrito acima, conduziu à geração de algoritmos de projeto de antisentido altamente precisos e a uma grande variedade de sistemas de envio de oligonucleotídeos, permitem àqueles versados na técnica projetar e implementar abordagens de antisentido adequadas para regular a menor expressão das seqüências de gene sem ter que recorrer a testes indevidos e experimentação errônea.

Outro agente capaz de regular a menor uma GA 2-oxidase é uma molécula de ribozima capaz de especificamente clivar uma transcrição de mRNA que codifica uma GA 2-oxidase. Ribozimas estão cada vez mais sendo usadas para a inibição específica de seqüência da expressão de gene pela clivagem de mRNAs que codificam proteínas de interesse (Welch et al. (1998) *Curr Opin Biotechnol* 9, 486 - 496). A possibilidade de projetar ribozimas para clivar qualquer RNA alvo específico as tornou ferramentas valiosas tanto na pesquisa básica como em aplicações terapêuticas.

Um método adicional de regular a expressão de um gene GA 2-oxidase em células é por meio de formação triplex de oligonucleotídeos (TFOs). Estudos recentes mostram que a TFOs pode ser projetada para reconhecer e ligar a regiões de polipurina ou polipirimidina em DNA helicoidal de dupla fita em uma maneira específica de seqüência. As referidas regras de reconhecimento são delineadas em: Maher III et al. (1989) *Science* 245, 725 - 730; Cooney et al. (1988) *Science* 241, 456 - 459). Modificações dos oligonucleotídeos, tais como a introdução de intercaladores e substituições de estrutura, e otimização das condições de ligação (por exemplo, pH e concentração de cátion) ajudaram na superação dos obstáculos inerentes a atividade de TFO tal como repulsão de carga e instabilidade, e foi recentemente mostrado que os oligonucleotídeos sintéticos podem ser direcionados à seqüências específicas (para uma revisão recente, ver Seidman et al. (2003) *J Clin Invest* 112, 487 - 494).

Assim, uma seqüência de formação triplex pode ser desenvolvida para qualquer seqüência determinada em uma região de GA 2-oxidase regulatória. A formação triplex de oligonucleotídeos preferivelmente é de pelo menos 19, mais preferivelmente 25, ainda mais preferivelmente 30 ou mais, nucleotídeos de comprimento, até 50 pares de base.

Deve ser entendido que qualquer das seqüências de silenciamento de nucleotídeos da presente invenção pode compreender pelo menos uma modificação 2'-açúcar, pelo menos uma modificação de base de ácido nucléico, e/ou pelo menos uma modificação de estrutura de fosfato.

A regulação a menor da expressão de gene se refere à diminuição ou ausência a nível de proteína e/ou produto de mRNA do gene alvo, isto é, Gene GA 2-oxidase. As con-

seqüências da regulação a menor da formação triplex de oligonucleotídeos pode ser confirmada ao se examinar as propriedades externas da célula ou planta ou por técnicas mecânicas tais como hibridização de solução de RNA, proteção de nuclease, hibridização Northern, transcrição reversa, a expressão de gene monitorando com uma microestrutura, ligação de anticorpo, teste de imunoabsorção ligada à enzima (ELISA), Western blotting, radioimunoteste (RIA), e análise de célula ativada a fluorescência (FACS). Para inibição mediada a RNA em células, a expressão de gene é convenientemente testada pelo uso de um gene reportador ou de resistência a droga cujo produto protéico é facilmente testado.

As plantas transgênicas que compreendem uma seqüência de nucleotídeo silenciamento como descrito na presente invenção podem ser usadas em diversas indústrias na produção de papel, têxteis, cabos, sacos, madeira, móveis, e semelhante.

EXEMPLOS

Materiais e métodos

Plantas: *Arahdopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotipo Columbia

Nicotiana tabacum L. cv samsun NN

Kenaf - *Hibiscus cannabinus* L. cv Tainung 2

Cepa *Agrobacterium tumefaciens*:

GV3101 - Usado para a transformação de kenaf, *Arabidopsis*, e tabaco (Hellens et

al. (2000) Trends Planta Sci 5: 446 - 451). Antibiotic resistance: Rifampicin e Gentamycin.

Meio de desenvolvimento de bactéria

O meio de desenvolvimento para bactéria foi preparado como anteriormente descrito (Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Para o meio sólido 1,5% peso em volume do agar foi adicionado. Antibióticos foram adicionados à concentração final de: Ampicilina 100 µg/mL, canamicina 50 µg/mL para bactéria e 100-250 µg/mL para plantas, Spectinomina 100µg/mL, Rifampicina 100 µg/mL, e Gentamicina 100 µg/mL.

Desenvolvimento do meio de planta

Murashige & Skoog - MS

4,4 g MS #M0222 (Duchefa Biochemic B.V., The Netherlands) meio e 15 g de sucrose por litro. O pH foi ajustado a 5.8 com 1N KOH. Para o meio sólido 0,6% peso em volume de Planta Agar #P1001 foi adicionado (Duchefa Biochemic B.V., The Netherlands). Antibióticos (se necessário) foram adicionados a uma concentração final de: Canamicina 100 – 250 µg/mL Higromicina 15 µg/mL, e G418 15 µg/mL.

Primers

Primer	Seqüência (5' → 3')	Objetivo Pretendido
CaMV 35S pro	CAAGACCCTTCCTCTATATAAG	Identificação da presença do pro-

extremidade	SEQ ID NO: 5	motor CAMV 35S
NOS terminador reverso	TTATCCTAGTTTGC GCGCTA SEQ ID NO: 6	Identificação da presença de terminador NOS
M13-20	TGTAAACGACGGCCAGT SEQ ID NO: 7	Primers Universal
M13-21	AACAGCTATGACCATGATTACG SEQ ID NO: 8	
GMO35S REV	GCTCCTACAAATGCCATCA SEQ ID NO: 9	Identificação do promotor CAMV 35S positivo plantas transgênicas
GMO35S FOR	GATAGTGGGATTGTGCGTCA SEQ ID NO: 10	
AT-GA20Hope5'	ATGGATCCTATGGCCGTAAGTTT CGTA ACAAC SEQ ID NO: 11	Clonagem pBinPlus (BamHI e EcoRI)
AT-GA20Hope3'	ACGAATTCGGTTAGATGGGTTTG GTGAGCCAATCTG SEQ ID NO: 12	
AT-GA20Over5'	GGTCTAGAATGGCCGTAAGTTTC GTAACAAC SEQ ID NO: 13	clonagem pBIN-GFP (XbaI)
AT-GA20Over3'-parada	CCTCTAGAGATGGGTTTGGTGAG CC SEQ ID NO: 14	
AT-gA20Over3'+parada	CCTCTAGATTAGATGGGTTTGGT GAGCC SEQ ID NO: 15	
ATGA2ClaKpn	CCATCGATGGTACCCCTGAAAGT TCCCGGGCTTTTG SEQ ID NO: 16	clonagem pKannibal
ATGA2BamHI-EcoRI	CGGGATCCCGGAATTCCGCAAT GGCGGTATTG TCTAAACC SEQ ID NO: 17	
GA2TABACsentido 5'	ACTCGAGAGATTGGATTTGGTGA GC SEQ ID NO: 18	clonagem pKannibal
GA2TABACanti 5'	AATCGATAACCTGCAATGAGTCA CC SEQ ID NO: 19	
GA2TABACsentido 3'	AGGTACCAACCTGCAATGAGTCA CC SEQ ID NO: 20	
GA2TABACanti 3'	GTCTAGAAGATTGGATTTGGTGA GC SEQ ID NO: 21	clonagem pKannibal
5' kenaf anti	GATCGATGCAGAGTCACTCTGCT CGTCC SEQ ID NO: 22	clonagem pKannibal

3' kenaf sentido	CGGTACCCCAGAGTCACTCTGCT CGTCC SEQ ID NO: 23	
5' kenaf anti	GTCTAGAGGTGATCAACCATGG GGTTCCC SEQ ID NO: 24	
3' kenaf sentido	CCTCGAGGGTGATCAACCATGG GGTTCCC SEQ ID NO: 25	
GA2kenaf aninhado	GGGCAGCCCCAAACCTTATGG SEQ ID NO: 26	Primer aninhado para o gene de kenaf GA2-Oxidase gene
GA2kenaf5'	ATGGTGTATTATTATCAAAACCTGG AATTG SEQ ID NO: 27	Primers para o gene de kenaf GA2-Oxidase
GA2kenaf3'	GCCTAAAAGATAGAGAGATTATG AGGCAGC SEQ ID NO: 28	Primers para o gene de kenaf GA2-Oxidase
Inverso1 kenaf GA2	CCATGGGAACCCCATGGTTGATC AC SEQ ID NO: 29	Primers para inverso PCR usado para o isolamento de kenaf GA2-Oxidase
Inverso2 kenaf GA2	GCGGCAAAGAGAAGAAGAACTCGGT GGC SEQ ID NO: 30	
Inverso3 kenaf GA2	CAGGCTGAACCATTACCCTCCAT GCCC SEQ ID NO: 31	
Inverso4 kenaf GA2	CGACAATGTGATTGGATTTGGG GAGC SEQ ID NO: 32	
KenafDeg5'	TGYGARGARTTYGGYTTYTTYAA RG SEQ ID NO: 33	Primers degenerados para o isolamento de kenaf GA2-Oxidase 5' é dotada de 256 permutações 3' é dotada de 512 permutações
KenafDeg3'	GGRTCDGTRTGYTCNCGRAANC C SEQ ID NO: 34	

Procedimentos Moleculares

Técnicas moleculares de DNA padrão foram realizadas de acordo com Sambrook et al., *ibid*, e Ausubel et al. (Protocols in Molecular Biology. (1987) New York, NY: John Wiley e Sons).

5 Produção de DNA de plasmídeo

DNA de plasmídeo para manipulações e seqüenciamento de rotina foi extraído de acordo com a Alkaline Lysis Miniprep (Sambrook et al., *ibid*).

Reação em cadeia de Polimerase (PCR)

10 PCR foi usado para amplificação de gene, detecção de gene e clonagem. A não ser que de outro modo mencionado, as condições de reação foram como a seguir: 5 ng - 100 ng de matriz de DNA, 0,05 mM dNTPs, 7,5 µM de cada primer, 10 mM Tris pH 8.8, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mg/mL BSA e 0,125 - ,05 µL Taq DNA

Polimerase em um volume final de 25 µL. As condições de reação foram: 94°C por 10 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C - 62°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos e uma etapa final de 72°C por 10 minutos.

Seqüenciamento e análise de seqüência

5 O seqüenciamento de DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia de dideoxynucleotídeo de Sanger (Sanger F. (1981) Science 214: 1205 - 1210) usando um seqüenciador automático de DNA fluorescente. Pesquisas de homologia dos bancos de dados foram realizadas usando a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool do National Center for Biotechnology Information. Nucleotídeo e seqüências de amino áci-
10 do foram analisadas usando Clustal W.

Análise de DNA de planta

Isolamento de Micro DNA

Tampão de extração de DNA: 0,35 M de Sorbitol, 0,1 M de Tris-HCl pH – 7,5, 5 mM de EDTA. 0,02 M de bisulfeto de Na foi adicionado antes do uso.

15 Tampão de lise de núcleo: 0,2 M de Tris pH – 7,5, 50 mM de EDTA, 2M de NaCl, 2% de CTAB.

Mistura de tampão de extração - 1 volume tampão de extração de DNA, 1 volume de tampão de lise de núcleo, 0,4 volume de 5% de Sarcosyl (peso em volume em ddH₂O).

20 Cem mg de folhas frescas, a partir da região de meristema apical, foram congeladas e trituradas em nitrogênio líquido usando um palito de madeira. Tecidos triturados foram então homogeneizados com 400 µL de mistura de tampão de extração e centrifugado por 1 minuto. As misturas homogeneizadas foram então incubadas por 40 minutos a 65°C. Os lisados foram extraídos uma vez com 1:1 volume:volume de clorofórmio. Os tubos
25 foram centrifugados por 5 minutos seguido por centrifugação por 5 minutos a 15,000 g em uma centrífuga Eppendorff. Dois-terços do volume de isopropanol e 0,1 volumes de 3M de NaOAc pH 6 foram adicionados à fase aquosa de precipitação de DNA. Os tubos foram incubados por 30 minutos a -20°C e então centrifugados a 20,000 g por 30 minutos a 4°C. Grânulos de DNA foram lavados uma vez com 70% de etanol e dissolvidos em 100 µL de
30 ddK₂O.

Análise Southern blot

Digestores de restrição, eletroforese em gel de agarose, Southern blots, hibridização e autoradiografia foram basicamente realizados como descrito por Bernatzky e Tanksley (Plant Mol. Biol. Rep. 4: 37 - 41, 1986) e Sambrook et al. ibid.

35 Mistura de marcação de Primer:

TM – 0,25 M de Tris pH 8, 0,025 M de MgCl₂, 0,005 M de DTT (armazenado a 4°C)
OL - 90 Unidades/mL de Hexadeoxinucleotídeo (Boehringer Mannheim) em TE (armazenado

a -20°C) DTM – 0,1 mM de dATP, dGTP e dTTP em TM (armazenado a -20°C) LS – 500 µL de HEPES 1M pH 6.6, 500 µL de DTM, 140 µL de OL (armazenado a -80°C).

Quarenta µg de DNA genômico foram digeridas com a enzima de restrição desejada, usando os tampões recomendados pelo fornecedor em um volume de reação de 150 µL com a adição de espermidina a uma concentração final de 4 mM e Rnase A a uma concentração final de 100 µg/mL. Fragmentos de DNA digeridos foram separados em um gel de agarose a 1% pré corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL usando o tampão NEB (0,1 M de base Tris, 10 mM de EDTA pH – 8,1, 126 mM de acetato de Na). Após a eletroforese, géis foram fotografados sob luz ultravioleta. O DNA foi cortado por irradiação de UV (254 nm) por 3 minutos antes de transferência capilar. O gel de agarose embebido de DNA foi incubado por 1,5 horas em uma solução de desnaturação (1M NaCl, 0,5 M NaOH) e então lavado por 3 vezes em ddH₂O estéril. O gel de agarose foi então incubado por outra 1,5 horas em uma solução de neutralização (1,5 M de NaCl, 0,5 M de Tris pH 7) e então lavada duas vezes em ddH₂O. DNA foi manchado sobre membranas Hybond N+ (Amersham-Biosciences, Sweden) usando 20 X SSC por 20 horas. As manchas foram lavadas em 2 X SSC e secas. As sondas foram marcadas com P³² dCTP usando o protocolo a seguir:

Cerca de cinquenta ng de DNA foram fervidos com 18 µL de ddH₂O por 5 minutos e imediatamente resfriados em gelo antes da adição de 11 µL de LS, 5 µL de BSA (1 mg/mL), 5 µL dCTP e 1 µL de fragmento Klenow de DNA polimerase (volume total 40 µL). A mistura de marcação foi incubada por 1 hora a 37°C e os nucleotídeos não incorporados foram removidos usando micro colunas ProbeQuant G50 spin (Amersham).

Pré-hibridização e hibridização

A pré-hibridização e a hibridização foram realizadas em tubos de plástico/vidro em uma incubadora de agitação orbital a 25 rpm a 65°C. As membranas foram pré-hibridizadas em 45 mL de tampão de hibridização que contém 0,263 M de Na₂HPO₄, 7% de SDS, 1 mM de EDTA, 1% BSA por duas horas (20 mL de tampão de pré-hibridização é suficiente para uma mancha de 20 cm x 10 cm). Uma sonda foi desnaturada por 10 minutos em água fervente antes de ser adicionada a 30 mL de tampão de hibridização. A hibridização foi realizada durante a noite em um agitador orbital a 65°C. As membranas foram então lavadas uma vez em 0,263 M de Na₂HPO₄, 1% de SDS por 20 minutos a 65°C, seguido por 1 lavagem de 20 minutos com 2 X SSC, 0,1% SDS e uma terceira lavagem de 20 minutos com IX SSC, 0,1% de SDS. As membranas foram então levemente secas, envolvidas em plástico e expostas a filme de raio-X Kodak Bio max-MS por 24 - 72 horas usando a tela de intensificação Kodak a -80°C.

Análise de RNA de Planta

Isolamento de RNA Miniprep

Folhas ou sementes foram trituradas com almofariz e pilão sob nitrogênio líquido. Cerca de 150 mg foram usadas para isolamento de RNA total usando o kit de isolamento de RNA total SV #23200 (Promega, USA) de acordo com o protocolo do fabricante.

Construção de plasmídeos de silenciamento

5 O vetor pKannibal (Wesley et al. Plant J. 27: 581 - 590, 2001) foi usado para silenciar GA 2-Oxidases de *Arabidopsis*, tabaco e kenaf. Dois fragmentos de complementação de cada planta foram clonados PCR usando Primers Kannibal. Fragmentos de sentido foram clonados com KpnI e XhoI, fragmentos antisentido foram clonados com ClaI e XbaI. As orientações de sentido e antisentido foram clonadas em um vetor pKannibal. O pKannibal que contém os fragmentos de sentido e antisentido foi digerido com *NotI* e então subclonado no vetor binário pArt27 (Gleave, A.P. Plant Mol Biol 20: 1203 - 1207, 1992). Os construtores resultantes foram introduzidos por eletroporação em *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

Construção de plasmídeos super expressão

15 Para os testes de super expressão, o gene de GA20-Oxidase genômico de *Arabidopsis* foi clonado separadamente em pBinPlus e pNoga (o último é uma variante de pBinI9+ que contém o gene GFP) entre o promotor 35S que contém o sinal intensificador de tradução e a terminador Nos plus N terminal Myc e C terminal GFP tag, respectivamente. Os construtores resultantes foram eletroporados em *Agrobacterium* 20 *tumefaciens* GV3101. As referidas cepas de *Agrobacterium* foram usadas para transformar a *Arabidopsis*, tabaco e plantas kenaf.

Transformações de Planta

Transformações estáveis de *Ambidopsis*

A transformação foi realizada pelo método de imersão floral (Clough et al., Plant 25 Journal 16: 735 - 743, 1998). Em suma: plantas foram desenvolvidas até a florescência. No dia da transformação a siliqua e as flores foram aparadas. A cultura de *Agrobacterium* que porta o vetor binário foi resuspensa para $OD_{600} = 0,5$ em 5% de solução de sucrose. Antes da imersão, Silweet L-77 foi adicionado a uma concentração de 0,05% e bem misturado. As partes da planta acima do solo foram imersas na solução Agro por 2 - 3 segundos, com agitação suave. As plantas imersas foram dispostas em uma bandeja coberta por 24 horas para manter a umidade no ambiente de desenvolvimento sem exposição à luz extensiva. As plantas foram desenvolvidas normalmente até que as sementes se tornaram maduras. As sementes secas foram coletadas e os transformantes foram selecionadas em placas MS que contém 50 µg/mL de canamicina. Os transformantes putativos foram trans- 35 feridos para o solo.

Transformação estável do tabaco

Plantas de *Nicotiana tabacum* cv samsun NN foram transformadas como anteri-

ormente descrito (Horsh et al. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 50: 433 - 437, 1985). Em suma, plantas de tabaco foram desenvolvidas sob condições estéreis em caixas Magenta boxes que contêm meio MS solidificado (0.6% Planta Agar, Duchefa, The Netherlands). Folhas foram cortadas em pequenos retângulos e incisões foram produzidas em direção à

5 veia central. As folhas foram então incubadas por 20 minutos em uma cultura durante a noite de *Agrobacterium tumefaciens* que contém o vetor desejado diluído em Meio líquido MS a uma OD₆₀₀ final de 0,5. Após mancha em papel estéril as folhas foram co-cultivadas por 2-3 dias em um meio MS suplementado com 2 mg/mL cinetina e 0,8 mg/mL de IAA (Sigma). Então as folhas foram transferidas para meio MS solidificado que contém 2 mg/mL

10 cinetina, 0,8 mg/mL de IAA, 400 mg/litro de cloranfenicol e 100 mg/mL canamicina. Os calos foram transferidos para meio fresco a cada duas semanas até a regeneração do broto. Os brotos regenerados foram então transferidos ao meio MS solidificado suplementado com 100 mg/litro de canamicina e 400 mg/litro de cloranfenicol. Os brotos regenerados que cresceram na presença de 100 mg/litro de canamicina foram dispostos em potes e transferidos

15 a uma câmara de desenvolvimento a 25°C. As plantas positivas resistentes a canamicina foram examinadas quanto à presença do gene inserido seja por PCR ou por análise de Southern blot.

Testes de expressão transitória

Clones de vetor binário foram introduzidos por eletroporação em cepas de

20 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Células de *Agrobacterium* foram desenvolvidas em meio LB durante a noite a 28°C, diluídas em meio de indução VIR (50 mM MES pH 5,6, 0,5% (peso em volume) glicose, 1,7 mM de NaH₂PO₄, 20 mM de NH₄Cl, 1,2 mM de MgSO₄, 2 mM de KCl, 17 µM de FeSO₄, 70 µM de CaCl₂ e 200 µM de acetosiringona) e desenvolvidas por 6 horas adicionais até que OD₆₀₀ alcançou 0,4 – 0,5. As culturas de *A-*

25 *grobacterium* foram então diluídas a uma OD₆₀₀ final de 0,2 e as suspensões foram injetadas com uma seringa sem agulha nas folhas de tabaco e plantas kenaf. As folhas foram observadas sob um microscópio confocal para a expressão de GFP.

Preparação de tecido e microscopia

Seções de um a três mm de espessura dos tecidos do caule foram cortadas a

30 mão. As seções foram coradas a temperatura ambiente com uma solução a 0,4% de lacmoide (PoliScience, Niles, IL) em 90% de ácido láctico por cerca de 2 segundos, e então enxaguada em água morna até que a cor residual tenha sido retirada por lavagem. Subseqüentemente, as seções foram transferidas a 50% de lactato de sódio para análise microscópica sob luz branca transmitida (Aloni e Barnett, Planta 198: 595 - 603, 1996).

GA 2-Oxidase de Kenaf e isolamento parcial do gene GA 2-oxidase de tomate

Primers Degenerados

Quatro seqüências de amino ácido diferentes de GA 2-Oxidase de planta fo-

ram alinhadas (números de acesso NCBI: Q8LEA2, Q9XFR9, BAD17856.1, e AAQ93035.1). As regiões altamente conservadas foram identificadas usando Clustal W. A região mais longa e mais conservada foi traduzida invertida com o programa Mac Vector (Accelrys Software Inc.). As permutações foram reduzidas de acordo com o uso de códon de planta (Murray E. et al., 1999). As seqüências de primer degenerado resultante foram:

5' dianteira: 5'- TGYGARGARTTYGGYTTYTTYAARG -3'

3' invertida: 5'- GGRTCDGTRTGYTCNCGRAANCC -3'

PCR Inverso

PCR em kenaf e DNA genômicos extraídos de tomate foi realizado usando os primers degenerados (relacionados aqui acima). Os amplicons resultantes foram clonados no plasmídeo pTZ57R/T e seqüenciados. De acordo com a referida seqüência 4 primers foram projetados (*isto é* Inverso 1-4, ver a lista de primers aqui acima) para amplificar o DNA genômico que margeia o produto PCR. Dois foram primers externos e dois para um PCR subsequente. A matriz de DNA para PCR inverso foi preparada por tratamento de 10 µg de DNA genômico de kenaf com 20U de MseI a 37 °C por 3 horas, seguido por precipitação de etanol. Endonuclease de restrição de MseI foi escolhida pelo fato de que a sua seqüência de reconhecimento não ter sido encontrada dentro da seqüência de codificação do fragmento amplificado. Um micrograma de DNA MseI-tratado foi re-circulada com T4DNA ligase (4 U) a 4°C por 12 horas seguido por precipitação de etanol. A reação de PCR foi então executada em 100 ng de DNA genômico de planta auto-ligado usando os primers inversos. O produto PCR foi clonado no plasmídeo pTZ57R/T plasmídeo e seqüenciado. Base de dados NCBI foram então pesquisadas para seqüências homólogas ao gene isolado de kenaf.

EXEMPLO 1

Linhagens Transgênicas de *Arabidopsis*

Transformação de plantas *Arabidopsis* com um gene de GA 20-Oxidase direcionada por um promotor intensificado 35S

Primers foram projetados com base na seqüência GA 20-Oxidase de *Arabidopsis* (Xu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6640 - 6644, 1995). Os referidos primers foram usados para isolar a seqüência genômica de GA 20-Oxidase. A seqüência do Gene PCR-amplificado foi similar àquele da GA5 (número de acesso ATU20873). A análise Blast entre o gene clonado e o gene reportado apresentou algumas discrepâncias, entretanto nenhum espaço ou códons de parada foram encontrados. As referidas mudanças de pares de base foram improváveis ser mutações resultantes da reação de PCR uma vez que as mesmas foram adjacentes entre si e as mesmas apareceram em uma freqüência bastante alta, não concorrente com a freqüência de erro de polimerase Tag. A GA5 seqüência foi isolada a partir do ecotipo *Columbia* e introduzida no plasmídeo binário Ti, pBinI9Plus. O gene

GA 20-Oxidase foi clonado sob a regulação do promotor 35S promotor e ligado ao epítopo Myc em sua terminação N através do vetor de mediação pLola. Plantas *Arabidopsis* foram transformadas usando a cepa *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Linhagens T1 transgênicas foram selecionadas por desenvolvimento em meio que contém canamicina. As 5 linhagens de planta TI que foram aleatoriamente selecionadas foram consideravelmente mais altas do que as plantas wt de controle.

Transformação de plantas *Arabidopsis* com um gene construtor de supressão de GA 2-oxidase

Primers foram projetado, com base em seqüência de GA 2-Oxidase de *Arabidopsis* submitted NCBI (NCBI número de acesso NM_106491), para isolar um fragmento 373 bp (SEQ ID NO: 35), a seqüência da qual é como a seguir:

```

CAATGGCGGTATTGTCTAAACCGGTAGCAATACCAAATCCGGGTTCTCTCTA
AT   CCCGGTTATAGATATGTCTGACCCAGAATCCAAACATGCCCTCGTGAAAGCATGC
GAAGACTTCGGCTTCTTCAAGGTGATCAACCATGGCGTTTCCGCAGAGCTAGTCT
15  CTGTTTTAGAACACGAGACCGTCGATTTCTTCTCGTTGCCCAAGTCAGAGAAAAC
CCAAGTCGCAGGTTATCCCTTCGGATACGGGAACAGTAAGATTGGTCGGAATGGT
      GACGTGGGTTGGGTTGAGTACTTGTTGATGAACGCTAATCATGATTCCGGTTC
GG GTCCACTATTTCCAAGTCTTCTCAAAGCCCGGGAACTTTCAG

```

O fragmento foi clonado no vetor pKannibal em ambas as orientações sentido e 20 antisentido, que margeiam o íntron Pdk (Wesley et al., Plant J. 27: 581 - 590, 2001). O referido vetor foi sub-clonado no vetor binário pArt27 (Gleave, Planta Mol Biol 20: 1203 - 1207, 1992).

O vetor foi electroporado na cepa *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 usada para transformação de planta. Linhagens transgênicas TI foram selecionadas por desenvolvi- 25 mento em meio que contém canamicina.

A seqüência complementar de SEQ ID NO: 35 é como a seguir (SEQ ID NO: 39):

```

CTGAAAGTTCCCGGGCTTTTGAGAAGACTTGGAATAGTGGACCCGAACCGGAAT
CATGATTAGCGTTCATCAACAAGTACTCAACCCAACCCACGTCACCATTCCGACC
AATCTTACTGTTCCCGTATCCGAAGGGATAACCTGCGACTTGGGTTTTCTCTGACT
30  TGGGCAACGAGAAGAAATCGACGGTCTCGTGTTCTAAAACAGAGACTAGCTCTG
CGGAAACGCCATGGTTGATCACCTTGAAGAAGCCGAAGTCTTCGCATGCTTTCACGAGG
GC      ATGTTTGGATTCTGGGTCAGACATATCTATAACCGGGATTAGAGAGAAC
CCGGATTTTGGTATTGCTACCGGTTTAGACAATACCGCCATTG

```

Caracterização fenotípica das linhagens transgênicas de *Arabidopsis*

35 Linhagens TI de ambas as transformações, super expressão de GA 20-Oxidase e silenciamento de GA 2-Oxidase, foram plantadas, e as amostras de folha foram coletadas. O DNA genômico foi extraído e testado quanto à presença do transgene por PCR. Linha-

gens positivas para o transgene foram plantadas junto com as plantas de controle de tipo selvagem (wt). Durante o desenvolvimento das plantas as características anatômicas foram analisadas e comparadas às plantas de controle wt. Plantas que super expressam GA 20-Oxidase mostraram fenótipos similares ao da Planta de GA 2-Oxidase silenciadas. As plantas transgênicas se desenvolveram mais altas e floresceram mais rápido sob condições de dia longo (figura 1A).

A significante variância no número de internódios que constituem o eixo de inflorescência não foi detectado. Portanto, o aumento no desenvolvimento da planta pode ser atribuído ao alongamento do internódio.

Sob condições de dia curto as plantas wt desenvolveram rosetas tipicamente grandes enquanto que as linhagens transgênicas desenvolveram eixos de inflorescência típicos para as condições de dia longo (FIG 1B). As seções transversais do caule foram coradas com lacmoíde (identificando lignina nas células de fibras). As fibras nas linhagens transgênicas de GA 2-oxidase silenciada foram coradas de azul claro em uma comparação ao azul escuro das fibras wt, da mesma forma indicando uma redução no acúmulo de lignina nas paredes celulares (figura 2). Ademais, um grande aumento na contagem das fibras do xilema e densidade foi detectado nas linhagens transgênicas.

EXEMPLO 2

Linhagens Transgênicas do tabaco

Super expressão heteróloga do gene GA 20-Oxidase *Arabidopsis* em plantas de tabaco

Plantas *Nicotiana tabacum* foram transformada com o mesmo *Agrobacterium tumefaciens* que foi usado par inserir o gene GA20-Oxidase na *Arabidopsis*. O gene GA 20-Oxidase *Arabidopsis* foi clonado no vetor binário pNOGA entre o promotor 35S-Ct que contém o sinal intensificador de tradução e o gene GFP (proteína de fluorescência verde) seguido pelo terminador NOS. Linhagens T1 transgênicas foram selecionadas por desenvolvimento em meio que contém canamicina. A análise de Western blot confirmou a expressão de proteína.

Transformação das plantas de tabaco com um gene construtor de supressão de GA 2-oxidase

Primers foram projetados, com base na sequência de GA 2-oxidase de tabaco submetida NCBI (número de acesso AB125232 e AB125233), para isolar um fragmento de silenciamento 155 bp (SEQ ID NO: 36), a sequência do qual é como a seguir:

GATTGGATTTGGAGAGCATACTGACCCACAAATCATATCAGTATTGAGATCCAAC
AACACTTCCGGACTTCAAATATTACTCAAAAATGGCCACTGGATTTCTGTCCCAC
CTGATCCAAATTCTTTCTTCATTAATGTTGGTGATTTCATTGCAGG

A sequência que foi escolhida complementa os dois genes reportados da família

de GA 2-Oxidase de tabaco NCBI. O fragmento foi clonado no vetor pKannibal tanto na orientação de sentido como na de antisentido, que ladeiam o íntron Pdk. O referido vetor foi sub-clonado no vetor binário pART27. O vetor foi eletroporado na cepa *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 usada para transformação da planta. Linhagens T1 transgênicas foram selecionadas por desenvolvimento em meio que contém canamicina.

A seqüência complementar de SEQ ID NO: 36 é como a seguir (SEQ ID NO: 40):

CCTGCAATGAATCACCAACATTAATGAAGAAAGAATTTGGATCAGGTGGGACAG
AAATCCAGTGGCCATTTTTGAGTAATATTTGAAGTCCGGAAGTGTTGTTGGATCTC
AATACTGATATGATTTGTGGGTGAGTATGCTCTCCAAATCCAATC

Caracterização fenotípica das linhagens transgênicas do tabaco

Linhagens TI de super expressão da GA 2-oxidase heteróloga foram plantadas. Folhas foram cortadas e observadas sob um microscópio confocal para luminescência GFP. As linhagens que expressaram a GFP foram plantadas ao longo do lado de plantas wt. Após cerca de 2,5 meses, medições anatômicas foram obtidas a partir dos internódios ao longo do caule. As linhagens transformadas foram mais altas do que o controle (figura 3). Um significativo aumento no número de internódios foi detectado entre três linhagens transgênicas e a wt, ao contrário do fenótipo em *Arabidopsis*. Entretanto, como em *Arabidopsis*, a transformação resultou em comprimentos mais longos de internódio. A diferença de comprimento do internódio foi mais proeminente nos internódios mais longos. Seções transversais do caule foram preparadas e observadas sob a luz de um microscópio em seguida de coloração com lacmoíde. As plantas transformadas produziram dramaticamente mais fibras de floema interno (figura 4) e uma contagem geral de fibra superior (Tabela 2) em comparação com a wt de controle. De acordo com a diferença no comprimento do internódio, um número destacadamente superior de internódios em estagio de desenvolvimento foi identificado nas plantas transgênicas uma vez que as mesmas não exibiram iniciação de fibra que foi observada nos mesmos internódios das plantas wt de controle, deste modo indicando que a super expressão de GA 20-Oxidase acelera o desenvolvimento da planta. A redução na lignina encontrada em *Arabidopsis* não foi proeminente nas plantas transgênicas de tabaco.

Linhagens TI de GA 2-Oxidase silenciada foram plantadas junto com wt de controle. As características anatômicas foram medidas. O número de internódios não diferiu significativamente entre os dois grupos embora as quatro linhagens mais altas foram 20% - 60% mais altas (figuras 5 e 6). O tamanho da folha foi também impactado pelo silenciamento. As folhas transgênicas foram mais longas e se encontravam em internódios mais altos do que nas plantas wt.

EXEMPLO 3

Isolamento de silenciamento de kenaf e tomate

Primers degenerados para GA 2-Oxidase foram projetados com base nas seqüências submetidas NCBI a partir de uma gama de espécies como descrito em Materiais e Métodos aqui acima. Os referidos primers foram usados para análise de PCR em DNA genômico que foi extraído a partir de folhas jovens de kenaf e tomate. PCR de baixo rigor foi programado usando a temperatura de hibridização de 54° C. O fragmento de kenaf amplificado foi 473 bp de comprimento e não pareceu incluir quaisquer íntrons (ver aqui abaixo). Portanto, o mesmo foi usado para construir um vetor de silenciamento por meio de pKANNIBAL como descrito para *Arabidopsis* e tabaco. O fragmento de tomate amplificado foi 488 bp de comprimento (ver aqui abaixo). Ambas as seqüências foram confirmadas como fragmentos de GA 2-Oxidase por sua tradução e análise BLAST a nível de amino ácido.

A seqüência de fragmento amplificado de kenaf (SEQ ID NO: 4) foi como a seguir:

```
GTGAGGAGTTTGGTTTCTTCAAAGTGATCAACCATGGGGTCCCATGGAATTCAT
TTCCAGGCTTGAATCTGAAGCCACCGAGTTCTTCTCTTTGCCGCTTTCTGAGAAGG
AGAAAACAGGGCAGCCCCAACCTTATGGATATGGCAATAAAAGGATCGGTCCCA
ATGGTGATGTTGGTTGGGTTGAATATCTTCTCCTCATGACCAACCAAGACCCCAA
CCTCGCTACTGAAAACCCAGAAAGTTTCAGGGTTGCTTTGAATAATTATATGGCG
GCGGTGAAGAAGATGGCGTGCGAGATACTGGAAATGGTGGCGGATGGGCTGAAG
ATTCAACCGAGGAATGTGTTGAGCAAGCTGATGATGGACGAGCAGAGTGA CTCT
GTTTTCAGGCTGAACCATTACCCTCCATGCCCAGATGTTGTTCAATCTCTCAACGA
CAATGTGATTGGATTTGGGGAGCACACAGACCCA
```

A seqüência complementar de SEQ ID NO: 4 é como a seguir (SEQ ID NO.38):

```
TGGGTCTGTGTGCTCCCCAAATCCAATCACATTGTCGTTGAGAGATTGAACAACA
TCTGGGCATGGAGGGTAATGGTTCAGCCTGAAAACAGAGTCACTCTGCTCGTCCA
TCATCAGCTTGCTCAACACATTCCTCGGTTGAATCTTCAGCCCATCCGCCACCATT
TCCAGTATCTCGCACGCCATCTTCTTCACCGCCGCCATATAATTATTCAAAGCAAC
CCTGAAACTTTCTGGGTTTTTCAGTAGCGAGGTTGGGGTCTTGTTGGTCATGAGG
AGAAGATATTCAACCCAACCAACATCACCATTGGGACCGATCCTTTTATTGCCAT
ATCCATAAGGTTTGGGCTGCCCTGTTTTCTCCTTCTCAGAAAGCGGCAAAGAGAA
GAACTCGGTGGCTTCAGATTCAAGCCTGGAAATGAATTCCATGGGAACCCCATGG
TTGATCACTTTGAAGAAACCAAACTCCTCAC
```

A seqüência de fragmento de tomate amplificada (SEQ ID NO: 37) foi como a seguir:

```
TTGCGAGGAATTTGGTTTTTTTAAAGTCGTAAACCATGACGTTCTATAGAATTC
A TAAGTAACTCGAATCCGAAGCCATCAAATTCTTCTCCTCTCCCCTCTCTGAGAA
GCTAAAAGCAGGGCCTGCTGACCCTTTTGGCTATGGCAATAAACAAATCGGACA
AAGTGGCGATATCGGTTGGGTTGAATACATTCTCCTTTCAACAACTCTGAATTC
```

AATTACCAGAAATTCGCATCTGTATTAGGTGTCAATCCAGAAAACATTCGGTAAG
 TCATTA AAAAGCAGAGCAAACAGAGTGATGTCTTTTAATCTCGATTCTTGATTTTT
 GTTATTGTTATTGNTATTGCAGAGCTGCGGNGAANGATTATGTGGCAGCAGTGAA
 GAGAANGTCATGTGAGATTCTTGAAGAAGTTGGCGGAGGGATTAAAGATTCATC
 5 CGNCGAATGTTTTCGGTAAGCTTTTGAAGGATGAAAAGAGCGACTCTG

A seqüência complementar de SEQ ID NO: 37 é como a seguir (SEQ ID NO: 41):

CAGAGTCGCTCTTTTCATCCTTCAAAGCTTACCGAAAACATTCGNCGGATGAAT
 CTTTAATCCCTCCGCCAACTTCTTCAAGAATCTCACATGACNTTCTCTTCACTGCT
 GCCACATAATCNTTCNCCGCAGCTCTGCAATANCAATAACAATAACAAAAATCAA
 10 GAATCGAGATTAAAAGACATCACTCTGTTTTGCTCTGCTTTTAATGACTTACCGAA
 TGTTTTCTGGATTGACACCTAATACAGATGCGAATTTCTGGTAATTGAATTCAGAG
 TTTGTTGAAAGGAGAATGTATTCAACCCAACCGATATCGCCACTTTGTCCGATTTG
 TTTATTGCCATAGCCAAAAGGGTCAGCAGGCCCTGCTTTTAGCTTCTCAGAGAGG
 GGAGAGGAGAAGAATTTGATGGCTTCGGATTTCGAGTTTACTTATGAATTCTATAG
 15 GAACGTCATGGTTTACGACTTTAAAAAAACCAAATTCCTCGCAA

EXEMPLO 4

O isolamento complete do gene GA 2-oxidase de kenaf

Os fragmentos de DNA obtidos por PCR usando os primers degenerados foram
 usados para projetar primers para PCR inversa seguido por um PCR aninhado como
 20 descrito em Materiais e Métodos aqui acima. O amplicon do PCR aninhado foi clona-
 do no plasmídeo pUC57R/T e seqüenciado. A seqüência foi verificada por três seqüên-
 cias independentes em três plasmídeos inseridos em amplicons independentes. Conse-
 quentemente, a seqüência genômica completa de GA 2-Oxidase de kenaf (SEQ ID NO: 3)
 foi identificada (figura 7).

25 O gene é 1134bp de comprimento e inclui diversas variantes de junções putati-
 vas. O mesmo não apresenta homologia de DNA aparente a qualquer gene conhecido,
 entretanto, há 63% de homologia e 76% de similaridade ao GA2Ox2 de *Nerium oleander*
 a nível de amino ácido. A seqüência de nucleotídeo de DNA (SEQ ID NO: 1) e a seqüên-
 cia de amino ácido (SEQ ID NO: 2) da GA 2-oxidase de kenaf são mostradas na FIGURA
 30 8.

Será observado por aqueles versados na técnica que a presente invenção não
 está limitada ao que foi particularmente mostrado e descrito aqui acima. Em vez disto o
 âmbito da presente invenção é definido pelas reivindicações a seguir.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Ramot at Tel Aviv University Ltd.

<120> **COMPOSIÇÕES PARA SILENCIAR A EXPRESSÃO DE GIBBERELLIN 2-OXIDASE E SEUS USOS**

<130> RAMOT/019 PCT

<150> US 60/802516

<151> 23-05-2006

<160> 41

<170> PatentIn versão 3.4

<210> 1

<211> 975

<212> DNA

<213> Hibiscus cannabinus

<400> 1

atggtgttat tatcaaaacc tggaattgaa cagttttctt atgttagaaa caagcagcca	60
gccgcattgt tccctcctct tatccctatc gtagacctct ccgaaccgga ttccagacac	120
cagatgatca aagcctgcga ggaattcgga ttcttcaagg tgatcaacca tgggggttccc	180
atggaattca tttccaggct tgaatccgag gccacccagt tcttctcttt accgctttcc	240
cagaaagaga aaacagggca gcccacacct tacggatatg gcaatagaag gatcgggtccc	300
aatggtgatg ttggttggct cgaatatctc ctctcacga ccaaccaaga cccaacctc	360
ccaactgaaa acccagatgg tttcagggtg gctttgaata attatatggc ggcgggtgaag	420
aaactggcgt gcgagatact tgaaatggtg gcggatgggc taaagattca acctcggaat	480
gtgttgagta agctgatgat ggatgagcag agtgactcgg ttttcaggct gaaccattac	540
cctccatgcc catcgtcgaa tggaaatgtg attggattcg gcgaacacac tgaccacaaa	600
atcatttcgg tcctaagatc caacaacact tctggccttc aaatctctct aagagacggc	660
tcttggattt cagtcccacc cgaccaccac tcatttttca tcaatgttgg tgattcctta	720
caggtaatga cgaatgggag gttcaaaaagt gtgaagcata ggggtgttggc gaacagtgtg	780
aaatcaaggc tgtcaatgat atatttctgt ggaccgcaa tgagtgagaa gatagcccca	840
ttgccatggt tgatgagggg agatcagcaa agcttgata aagaatttac atgggttgac	900
tacaaaactt ctgcttaca ctctagggtg gcagataaca ggctaataa cttcgagaaa	960
atagctgcct cataa	975

<210> 2

<211> 324

<212> PRT

<213> Hibiscus cannabinus

<400> 2

Met	Val	Leu	Leu	Ser	Lys	Pro	Gly	Ile	Glu	Gln	Phe	Ser	Tyr	Val	Arg
1				5					10					15	

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

Gln Gln Ser Leu Tyr Lys Glu Phe Thr Trp Phe Asp Tyr Lys Thr Ser
 290 295 300

Ala Tyr Asn Ser Arg Leu Ala Asp Asn Arg Leu Ile Asn Phe Glu Lys
 305 310 315 320

Ile Ala Ala Ser

<210> 3
 <211> 1134
 <212> DNA
 <213> Hibiscus cannabinus

<400> 3
 atggtgttat tatcaaaacc tggaattgaa cagttttctt atgttagaaa caagcagcca 60
 gccgcattgt tccctcctct tatccctatc gtagacctct ccgaaccgga ttccagacac 120
 cagatgatca aagcctgcga ggaattcgga ttcttcaagg tgatcaacca tgggggtccc 180
 atggaattca tttccaggct tgaatccgag gccaccaggt tcttctcttt accgctttcc 240
 cagaaagaga aaacagggca gcccaaactt tacggatatg gcaatagaag gatcgggtccc 300
 aatggtgatg ttggttggct cgaatatctc ctcttcacga ccaaccaaga ccccaacctc 360
 ccaactgaaa acccagatgg ttccaggtac cctttttttt tctttcttac cagagatagg 420
 gaatctgtta tcacagcttt tgaaactgtg tctgtgttgt tatttttcag ggtagctttg 480
 aataattata tggcggcggt gaagaaactg gcgtgcgaga tacttgaaat ggtggcggat 540
 gggctaaaga ttcaacctcg gaatgtgttg agtaagctga tgatggatga gcagagtgc 600
 tcggttttca ggctgaacca ttaccctcca tgcccatcgt cgaatggaaa tgtgattgga 660
 ttcggcgaac aactgaccc acaaatcatt tcggtcctaa gatccaaca cacttctggc 720
 cttaaatct ctctaagaga cggctcttgg atttcagtcc caccgacca ccactcattt 780
 ttcatcaatg ttggtgattc cttacaggta aataataaaa aaaattcctt cttttttacc 840
 aactgtgggt ctggtgcaaa gtgtgagctt gatgttggtc aggtaatgac gaatgggagg 900
 ttcaaaagtg tgaagcatag ggtgttggcg aacagtgtga aatcaaggct gtcaatgata 960
 tatttctgtg gaccgccaat gaggtagaag atagcccat tgccatgttt gatgagggga 1020
 gatcagcaaa gcttgtaaa agaatttaca tggtttgact acaaaacttc tgcttacaac 1080
 tctagggttg cagataacag gctaataaac ttcgagaaaa tagctgcctc ataa 1134

<210> 4
 <211> 473
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Polinucleotídeo sintético

<400> 4
 gtgaggagtt tggtttcttc aaagtgatca accatgggggt tcccatggaa ttcatttcca 60

ggcttgaatc tgaagccacc gagttcttct ctttgccgct ttctgagaag gagaaaacag 120
 ggcagcccaa accttatgga tatggcaata aaaggatcgg tccaatggt gatgttggtt 180
 gggttgaata tcttctcctc atgaccaacc aagaccccaa cctcgctact gaaaaccag 240
 aaagtttcag ggttgctttg aataattata tggcggcggg gaagaagatg gcgtgcgaga 300
 tactggaaat ggtggcggat gggctgaaga ttcaaccgag gaatgtgttg agcaagctga 360
 tgatggacga gcagagtgc tctgttttca ggctgaacca ttaccctcca tgcccagatg 420
 ttgttcaatc tctcaacgac aatgtgattg gatttgggga gcacacagac cca 473

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> **Seqüência Artificial**

<220>
 <223> **Polinucleotídeo sintético**

<400> 5
 caagaccctt cctctatata ag 22

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> **Seqüência Artificial**

<220>
 <223> **Polinucleotídeo sintético**

<400> 6
 ttatcctagt ttgcgcgcta 20

<210> 7
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> **Seqüência Artificial**

<220>
 <223> **Polinucleotídeo sintético**

<400> 7
 tgtaaaacga cggccagt 18

<210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> **Seqüência Artificial**

<220>
 <223> **Polinucleotídeo sintético**

<400> 8
 aacagctatg accatgatta cg 22

<210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> **Seqüência Artificial**

<220>			
<223>	Polinucleotídeo sintético		
<400>	9		19
	gctcctacaa atgccatca		
<210>	10		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	Seqüência Artificial		
<220>			
<223>	Polinucleotídeo sintético		
<400>	10		20
	gatagtggga ttgtgcbtca		
<210>	11		
<211>	32		
<212>	DNA		
<213>	Seqüência Artificial		
<220>			
<223>	Polinucleotídeo sintético		
<400>	11		32
	atggatccta tggccgtaag tttcgtaaca ac		
<210>	12		
<211>	36		
<212>	DNA		
<213>	Seqüência Artificial		
<220>			
<223>	Polinucleotídeo sintético		
<400>	12		36
	acgaattcgg ttagatgggt ttggtgagcc aatctg		
<210>	13		
<211>	31		
<212>	DNA		
<213>	Seqüência Artificial		
<220>			
<223>	Polinucleotídeo sintético		
<400>	13		31
	ggtctagaat ggccgtaagt ttcgtaacaa c		
<210>	14		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	Seqüência Artificial		
<220>			
<223>	Polinucleotídeo sintético		
<400>	14		25
	cctctagaga tgggtttggt gagcc		
<210>	15		

<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Polinucleotídeo sintético	
<400>	15	
	cctctagatt agatggggtt ggtgagcc	28
<210>	16	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Polinucleotídeo sintético	
<400>	16	
	ccatcgatgg taccctgaa agttcccggt cttttg	36
<210>	17	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Polinucleotídeo sintético	
<400>	17	
	cgggatcccg gaattccgca atggcggtat tgtctaaacc	40
<210>	18	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Polinucleotídeo sintético	
<400>	18	
	actcgagaga ttggatttgg tgagc	25
<210>	19	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Polinucleotídeo sintético	
<400>	19	
	aatcgataac ctgcaatgag tcacc	25
<210>	20	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Seqüência Artificial	
<220>		
<223>	Polinucleotídeo sintético	
<400>	20	

aggtaccaac ctgcaatgag tcacc	25
<210> 21	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	
<223> Polinucleotídeo sintético	
<400> 21	
gtctagaaga ttggatttgg tgagc	25
<210> 22	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	
<223> Polinucleotídeo sintético	
<400> 22	
gatcgatgca gagtcactct gctcgtcc	28
<210> 23	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	
<223> Polinucleotídeo sintético	
<400> 23	
cggtagccca gagtcactct gctcgtcc	28
<210> 24	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	
<223> Polinucleotídeo sintético	
<400> 24	
gtctagaggt gatcaaccat ggggttccc	29
<210> 25	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	
<220>	
<223> Polinucleotídeo sintético	
<400> 25	
cctcgagggt gatcaaccat ggggttccc	29
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Sequência Artificial	

<220>			
<223>	Polinucleotídeo sintético		
<400>	26		
	gggcagccca aaccttatgg		20
<210>	27		
<211>	28		
<212>	DNA		
<213>	Seqüência Artificial		
<220>			
<223>	Polinucleotídeo sintético		
<400>	27		
	atggtgttat tatcaaaacc tggaattg		28
<210>	28		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	Seqüência Artificial		
<220>			
<223>	Polinucleotídeo sintético		
<400>	28		
	gcctaaaaga tagagagatt atgaggcagc		30
<210>	29		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	Seqüência Artificial		
<220>			
<223>	Polinucleotídeo sintético		
<400>	29		
	ccatgggaac cccatgggtg atcac		25
<210>	30		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	Seqüência Artificial		
<220>			
<223>	Polinucleotídeo sintético		
<400>	30		
	gcggcaaaga gaagaactcg gtggc		25
<210>	31		
<211>	27		
<212>	DNA		
<213>	Seqüência Artificial		
<220>			
<223>	Polinucleotídeo sintético		
<400>	31		
	caggctgaac cattaccctc catgccc		27
<210>	32		

<211> 26
 <212> DNA
 <213> **Sequência Artificial**
 <220>
 <223> **Polinucleotídeo sintético**
 <400> 32
 cgacaatgtg attggatttg gggagc

26

<210> 33
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> **Sequência Artificial**
 <220>
 <223> **Polinucleotídeo sintético**

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> N= C or T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> N= A or G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> N= A or G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> N= C or T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> N= C or T

<220>
 <221> misc_feature.
 <222> (18)..(18)
 <223> N= C or T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> N= C or T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(24)
 <223> N= A or G

<400> 33
 tngngangant tnggnttntt naang

25

<210> 34
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> **Sequência Artificial**

<220>
<223> **Polinucleotídeo sintético**

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> N= A or G

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> N= A or G

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> N= C or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> n is a, c, g, t or u

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> N= A or G

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> n is a, c, g, t or u

<400> 34
ggntcdgtnt gntcncgnaa ncc

23

<210> 35
<211> 373
<212> DNA
<213> **Seqüência Artificial**

<220>
<223> **Polinucleotídeo sintético**

<400> 35
caatggcggt attgtctaaa ccggtagcaa taccaaaatc cgggttctct ctaatccccg 60
ttatagatat gtctgaccca gaatccaaac atgccctcgt gaaagcatgc gaagacttcg 120
gcttcttcaa ggtgatcaac catggcggtt ccgcagagct agtctctgtt ttagaacacg 180
agaccgtcga tttcttctcg ttgcccaggt cagagaaaac ccaagtcgca gggtatccct 240
tcggatacgg gaacagtaag attggtcgga atgggtgacgt gggttgggtt gagtacttgt 300
tgatgaacgc taatcatgat tccggttcgg gtccactatt tccaagtctt ctcaaaagcc 360
cggaacttt cag 373

<210> 36
<211> 155
<212> DNA
<213> **Seqüência Artificial**

<220>
 <223> **Polinucleotídeo sintético**

<400> 36
 gattggattt ggagagcata ctgaccaca aatcatatca gtattgagat ccaacaacac 60
 ttccggactt caaatattac tcaaaaatgg cactggatt tctgtccac ctgatccaaa 120
 ttctttcttc attaatgttg gtgattcatt gcagg 155

<210> 37
 <211> 488
 <212> DNA
 <213> **Sequência Artificial**

<220>
 <223> **Polinucleotídeo sintético**

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (345)..(345)
 <223> n is a, c, g, t or u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (362)..(362)
 <223> n is a, c, g, t or u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (366)..(366)
 <223> n is a, c, g, t or u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (392)..(392)
 <223> n is a, c, g, t or u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (443)..(443)
 <223> n is a, c, g, t or u

<400> 37
 ttgcgaggaa tttggttttt ttaaagtcgt aaaccatgac gttcctatag aattcataag 60
 taaactcgaa tccgaagcca tcaaattctt ctctctccc ctctctgaga agctaaaagc 120
 agggcctgct gacccttttg gctatggcaa taaacaaatc ggacaaagtg gcgatatcgg 180
 ttgggttgaa tacattctcc tttcaacaaa ctctgaattc aattaccaga aattcgcac 240
 tgtattaggt gtcaatccag aaaacattcg gtaagtcatt aaaagcagag caaacagag 300
 tgatgtcttt taatctcgat tcttgatttt tgttattggt attgntattg cagagctgcg 360
 gngaangatt atgtggcagc agtgaagaga angtcatgtg agattcttga agaagttggc 420
 ggagggatta aagattcatc cgncgaatgt tttcgtaag cttttgaagg atgaaaagag 480
 cgactctg 488

<210> 38
 <211> 473
 <212> DNA

<213> **Seqüência Artificial**

<220>

<223> **Polinucleotídeo sintético**

<400> 38

tggtgtctgtg tgctcccca atccaatcac attgtcgttg agagattgaa caacatctgg	60
gcatggaggg taatggttca gcctgaaaac agagtcactc tgctcgtcca tcatcagctt	120
gctcaacaca ttcctcgggt gaatcttcag cccatccgcc accatttcca gtatctcgca	180
cgccatcttc ttcaccgccg ccatataatt attcaaagca accctgaaac tttctgggtt	240
ttcagtagcg aggttgggggt cttggttggt catgaggaga agatattcaa cccaaccaac	300
atcaccattg ggaccgatcc ttttattgcc atatccataa ggtttgggct gccctgtttt	360
ctccttctca gaaagcggca aagagaagaa ctcggtggct tcagattcaa gcctggaaat	420
gaattccatg ggaaccccat ggttgatcac tttgaagaaa ccaaactcct cac	473

<210> 39

<211> 373

<212> DNA

<213> **Seqüência Artificial**

<220>

<223> **Polinucleotídeo sintético**

<400> 39

ctgaaagttc ccgggctttt gagaagactt ggaaatagtg gacccgaacc ggaatcatga	60
ttagcgttca tcaacaagta ctcaacccaa cccacgtcac cattccgacc aatcttactg	120
ttcccgtatc cgaagggata acctgcgact tgggttttct ctgacttggg caacgagaag	180
aaatcgacgg tctcgtgttc taaaacagag actagctctg cggaaacgcc atgggttgatc	240
accttgaaga agccgaagtc ttcgcatgct ttcacgaggg catgtttgga ttctgggtca	300
gacatatcta taaccgggat tagagagAAC ccggattttg gtattgctac cggttttagac	360
aataccgcca ttg	373

<210> 40

<211> 155

<212> DNA

<213> **Seqüência Artificial**

<220>

<223> **Polinucleotídeo sintético**

<400> 40

cctgcaatga atcaccaaca ttaatgaaga aagaatttgg atcaggtggg acagaaatcc	60
agtggccatt tttgagtaat atttgaagtc cggaagtgtt gttggatctc aatactgata	120
tgatttgtgg gtcagtatgc tctccaaatc caatc	155

<210> 41

<211> 488

<212> DNA

<213> **Seqüência Artificial**

<220>
 <223> **Polinucleotideo sintético**

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(46)
 <223> n is a, c, g, t or u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (97)..(97)
 <223> n is a, c, g, t or u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (123)..(123)
 <223> n is a, c, g, t or u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (127)..(127)
 <223> n is a, c, g, t or u

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (144)..(144)
 <223> n is a, c, g, t or u

<400> 41
 cagagtcgct cttttcatcc ttcaaaagct taccgaaaac attcgnccgga tgaatcttta 60
 atccctccgc caacttcttc aagaatctca catgacnttc tcttcactgc tgccacataa 120
 tcnttcnccg cagctctgca atancaataa caataacaaa aatcaagaat cgagattaaa 180
 agacatcact ctgttttgct ctgcttttaa tgacttaccg aatgttttct ggattgacac 240
 ctaatacaga tgcgaatttc tggtaattga attcagagtt tgttgaaagg agaattgtatt 300
 caacccaacc gatatcgcca ctttgtccga tttgtttatt gccatagcca aaagggtcag 360
 caggccctgc ttttagcttc tcagagaggg gagaggagaa gaatttgatg gcttcggatt 420
 cgagtttact tatgaattct ataggaacgt catggtttac gactttaaaa aaaccaaatt 480
 cctcgcaa 488



PI0712201-2

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucléico isolada, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende a seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO:1 codificando uma gibberellin 2-oxidase (GA 2-oxidase) de *Hibiscus cannabinus* (kenaf), ou uma
5 fita complementar ou uma seqüência homóloga à mesma, onde a seqüência homóloga é dotada de uma identidade de seqüência de pelo menos 80% para SEQ ID NO: 1.

2. Molécula de ácido nucléico isolada, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a seqüência homóloga é dotada de uma identidade de seqüência de pelo menos 90% para SEQ ID NO: 1.

10 3. Molécula de ácido nucléico isolada, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a seqüência homóloga é dotada de uma identidade de seqüência de pelo menos 95% para SEQ ID NO: 1.

4. Molécula de ácido nucléico isolada, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a seqüência homóloga é dotada de 100% de identidade de seqüência ou 100% de homologia de seqüência para SEQ ID NO: 1.
15

5. Polipeptídeo de GA 2-oxidase isolado de uma planta de kenaf (*Hibiscus cannabinus*), **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a seqüência de amino ácido como determinada em SEQ ID NO: 2, ou um análogo ou fragmento do mesmo, onde o análogo é dotado de uma homologia de seqüência de amino ácido de pelo menos
20 80% para SEQ ID NO: 2.

6. Polipeptídeo de GA 2-oxidase isolado de kenaf, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é dotado uma seqüência de amino ácido como determinada em SEQ ID NO: 2.

7. Molécula de ácido nucléico isolada, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é dotada de uma seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 3 codificando gibberellin 2-oxidase (GA 2-oxidase) de uma planta de kenaf (*Hibiscus cannabinus*).
25

8. Molécula de RNA de dupla fita que regula a menor a expressão do Gene de GA 2-oxidase do *Hibiscus cannabinus* (kenaf), **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende:

30 a) uma primeira fita de DNA do RNA de fita dupla compreendendo pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de seqüência a um RNA transcrito a partir de um gene de GA 2-oxidase de kenaf ou um fragmento do mesmo; e

b) uma segunda fita de RNA do referido RNA de fita dupla compreendendo pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência complementar do RNA transcrito a partir do gene de GA 2-oxidase de kenaf ou um fragmento do mesmo,
35

onde as primeira e segunda fitas de RNA são capazes de hibridização uma na

outra para formar a referida Molécula de RNA de fita dupla.

9. Molécula de RNA de fita dupla, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a primeira fita de RNA é dotada de pelo menos 95% de identidade de sequência para o RNA transcrito a partir do gene de GA 2-oxidase de kenaf ou um fragmento do mesmo.

10. Molécula de RNA de fita dupla, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a primeira fita de RNA é dotada de 100% de identidade de sequência para o RNA transcrito a partir de um Gene de GA 2-oxidase de kenaf ou um fragmento do mesmo.

10 11. Molécula de RNA de fita dupla, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o RNA transcrito a partir do gene de GA 2-oxidase de kenaf compreende a sequência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 1.

15 12. Molécula de RNA de fita dupla, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o fragmento do RNA transcrito a partir do gene de GA 2-oxidase de kenaf compreende a sequência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 4.

20 13. Molécula de RNA de fita dupla, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a segunda fita de RNA é dotada de pelo menos 95% de identidade de sequência para a sequência complementar do RNA transcrito a partir do gene de GA 2-oxidase de kenaf ou um fragmento do mesmo.

25 14. Molécula de RNA de fita dupla, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a segunda fita de RNA é dotada de 100% de identidade de sequência a uma sequência complementar do RNA transcrito a partir do gene de GA 2-oxidase de kenaf ou um fragmento do mesmo.

15. RNA de fita dupla, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as primeira e segunda fitas de RNA compreendem pelo menos 25 nucleotídeos, cada.

30 16. Construtor de DNA para gerar uma molécula de RNA capaz de regular a menor a expressão de um gene de GA 2-oxidase de kenaf, o construtor de DNA compreendendo um promotor de planta operacionalmente ligado a uma sequência de polinucleotídeo codificando uma sequência de RNA que forma um RNA de fita dupla, a sequência de polinucleotídeo compreendendo:

35 (i) uma primeira sequência de nucleotídeo compreendendo pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de sequência para a sequência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 1 ou um fragmento do mesmo; e

(ii) uma segunda sequência de nucleotídeo compreendendo pelo menos 20 nu-

cleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência complementar de uma seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 1 ou um fragmento do mesmo,

5 onde a molécula de RNA transcrita a partir do construtor de DNA regula a menor a expressão do gene de GA 2-oxidase de kenaf.

17. Construtor de DNA, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que as primeira e segunda seqüências de nucleotídeos cada uma das quais compreende pelo menos 25 nucleotídeos.

10 18. Construtor de DNA, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que as primeira e segunda seqüências de nucleotídeos cada uma das quais compreende pelo menos 50 nucleotídeos.

19. Construtor de DNA, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que as primeira e segunda seqüências de nucleotídeos cada uma das quais compreende pelo menos 100 nucleotídeos.

15 20. Construtor de DNA, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a primeira seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 95% de identidade de seqüência para a seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 1 ou um fragmento do mesmo.

20 21. Construtor de DNA, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a primeira seqüência de nucleotídeo é dotada de 100% de homologia de seqüência para a seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 1 ou um fragmento do mesmo.

25 22. Construtor de DNA, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a primeira seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência para a seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 4 ou um fragmento do mesmo.

30 23. Construtor de DNA, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a segunda seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 95% de identidade de seqüência para a seqüência complementar da seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 1 ou um fragmento do mesmo.

24. Construtor de DNA, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a segunda seqüência de nucleotídeo é dotada de 100% de homologia de seqüência para a seqüência complementar de uma seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 1 ou um fragmento do mesmo.

35 25. Construtor de DNA, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a segunda seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência para a seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID

NO: 38 ou um fragmento do mesmo.

26. Construtor de DNA, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o promotor de planta é selecionado a partir do grupo que consiste em promotores constitutivos, promotores induzíveis, promotores específicos de tecido, e promotores específicos de estágio de desenvolvimento.

27. Construtor de DNA, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que adicionalmente compreende um marcador selecionável.

28. Construtor de DNA, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que adicionalmente compreende uma sequência de controle de expressão selecionada a partir do grupo que consiste em um intensificador, um fator de transcrição, e um sinal terminador de transcrição.

29. Construtor de DNA, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que as primeira e segunda sequências de nucleotídeos são operacionalmente ligadas ao mesmo promotor.

30. Construtor de DNA, de acordo com a reivindicação 16, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que as primeira e segunda sequências de nucleotídeos são separadas por uma sequência espaçadora.

31. Construtor de DNA, de acordo com a reivindicação 30, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência espaçadora é um íntron.

32. Célula de planta, **CHARACTERIZADA** pelo fato de ser transformada com um RNA de fita dupla de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 15.

33. Célula de planta, de acordo com a reivindicação 32, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a célula é uma célula de planta de kenaf.

34. Célula de planta, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que é transformada com um construtor de DNA de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 31.

35. Célula de planta, de acordo com a reivindicação 34, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a célula é uma célula de planta de kenaf.

36. Planta transgênica, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que compreende pelo menos uma célula transformada com um RNA de fita dupla, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 15.

37. Planta transgênica, de acordo com a reivindicação 36, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que planta transgênica é uma planta de kenaf.

38. Planta transgênica. **CHARACTERIZADA** pelo fato de que compreende pelo menos uma célula transformada com um construtor de DNA de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 31.

39. Planta transgênica, de acordo com a reivindicação 38, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que planta transgênica é uma planta de kenaf.

40. Semente de planta transgênica, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser de acordo com qualquer uma das reivindicações de 36 to 39.

41. Caule de planta transgênica, **CARACTERIZADO** pelo fato de estar de acordo com qualquer uma das reivindicações de 36 a 39.

5 42. Método, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser para a produção de uma planta transgênica dotada de reduzida expressão de gene de GA 2-oxidase, o método compreendendo introduzir em pelo menos uma célula da planta um RNA de fita dupla de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 15.

10 43. Método, de acordo com a reivindicação 42, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a planta é uma planta de kenaf.

44. Método, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser para a produção de uma planta transgênica dotada de reduzida expressão de um gene de GA 2-oxidase, o método compreendendo introduzir em pelo menos uma célula de planta um construtor de DNA compreendendo um promotor de planta operacionalmente ligado a uma seqüência de polinucleotídeo codificando uma seqüência de RNA, a seqüência de polinucleotídeo compreendendo:

20 (i) uma primeira seqüência de nucleotídeo compreendendo pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma molécula de ácido nucléico codificando uma GA 2-oxidase da planta ou um fragmento do mesmo; e

(ii) uma segunda seqüência de nucleotídeo compreendendo pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência complementar da molécula de ácido nucléico codificando a GA 2-oxidase da planta ou um fragmento do mesmo,

25 onde a molécula de RNA transcrita a partir do construtor de DNA regula a menor a expressão do referido gene de GA 2-oxidase.

45. Método, de acordo com a reivindicação 44, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a planta é selecionada a partir do grupo que consiste em famílias de angiosperma e famílias de gimnosperma.

30 46. Método, de acordo com a reivindicação 45, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a planta pertence à família de angiosperma selecionada a partir do grupo que consiste em *Hibiscus* sp., *Populus* sp., *Eucalyptus* sp., *Helianthus* sp., *Corchorus* sp., e *Boehmeria* sp.

35 47. Método, de acordo com a reivindicação 46, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a planta is selecionada a partir do grupo que consiste em kenaf, *Helianthus annuus* L. (Sunflower), *Eucaliptus camaldulensis*, *Cannabis sativa* L., *Corchorus olitorius* L., e *Boehmeria nivea* L.

48. Método, de acordo com a reivindicação 47, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a planta é uma planta de kenaf.

49. Método, de acordo com a reivindicação 48, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a planta é uma planta de kenaf e o construtor de DNA é de acordo com a reivindicação 16.

50. Método, de acordo com a reivindicação 44, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a planta é *Arabidopsis*, e a primeira seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência para a seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 35 ou um fragmento do mesmo, a segunda seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência para a seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 39 ou um fragmento do mesmo.

51. Método, de acordo com a reivindicação 50, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a planta é tabaco, e a primeira seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência para a seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 36 ou um fragmento do mesmo, a segunda seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência para a seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 40 ou um fragmento do mesmo.

52. Método, de acordo com a reivindicação 50, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a planta é tomate, e a primeira seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência para a seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 37 ou um fragmento do mesmo, a segunda seqüência de nucleotídeo é dotada de pelo menos 90% de identidade de seqüência para a seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 41 ou um fragmento do mesmo.

53. Método, de acordo com a reivindicação 44, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa de introduzir o construtor de DNA é realizada por um método selecionado a partir do grupo que consiste em transformação mediada a *Agrobacterium*, bombardeio de micro-projétil, transformação mediada a pólen, transformação mediada a vírus de RNA viral, transformação mediada a lipossoma, transferência direta de gene, e eletroporação do caule embriogênico compacto.

54. Método, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser para aumentar a colheita de fibra de uma planta compreendendo introduzir em pelo menos uma célula de planta um construtor de DNA compreendendo um promotor de planta operacionalmente ligado a uma seqüência de polinucleotídeo codificando uma Seqüência de RNA, a seqüência de polinucleotídeo compreendendo:

(i) uma primeira seqüência de nucleotídeo compreendendo pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de seqüência para a molécula de ácido nucléico codificando uma GA 2-oxidase da planta ou um fragmento do

mesmo; e

(ii) uma segunda seqüência de nucleotídeo compreendendo pelo menos 20 nucleotídeos contíguos dotados de pelo menos 90% de identidade de seqüência a uma seqüência complementar da molécula de ácido nucléico codificando a GA 2-oxidase da referida planta ou um fragmento do mesmo,

onde a molécula de RNA transcrita a partir do construtor de DNA regula a menor expressão do gene de GA 2-oxidase.

55. Método, de acordo com a reivindicação 54, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a planta é selecionada a partir do grupo que consiste em famílias de angiosperma e famílias de gimnosperma.

56. Método, de acordo com a reivindicação 55, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a planta pertence à família de angiosperma selecionada a partir do grupo que consiste em *Hibiscus* sp., *Populus* sp., *Eucalyptus* sp., *Helianthus* sp., *Corchorus* sp., e *Boehmeria* sp.

57. Método, de acordo com a reivindicação 56, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a planta is selecionada a partir do grupo que consiste em kenaf, *Helianthus annuus* L. (Sunflower), *Eucaliptus camaldulensis*, *Cannabis sativa* L., *Corchorus olitorius* L., e *Boehmeria nivea* L.

58. Método, de acordo com a reivindicação 57, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a planta é uma planta de kenaf.

59. Método, de acordo com a reivindicação 54, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a planta é uma planta de kenaf e o construtor de DNA é de acordo com a reivindicação 16.

60. Nucleotídeo antisentido, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser orientado a uma região de uma molécula de ácido nucléico que compreende uma seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 3.

61. Seqüência de nucleotídeo, **CARACTERIZADA** pelo fato de que codifica uma ribozima capaz de clivar uma seqüência de RNA transcrita a partir da molécula de ácido nucléico que compreende a seqüência de nucleotídeo como determinada em SEQ ID NO: 1.

62. Vetor de expressão, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende uma molécula de ácido nucléico isolada de acordo com a reivindicação 1.

63. Célula de planta, **CARACTERIZADA** pelo fato de ser transformada com um vetor de expressão compreendendo uma molécula de ácido nucléico isolada de acordo com a reivindicação 62.

64. Planta transgênica, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende pelo menos uma célula de planta transformada com o vetor de expressão de acordo com a reivindicação 62.

65. Planta transgênica, de acordo com a reivindicação 64, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a planta transgênica é uma planta de kenaf.

5 66. Método, **CHARACTERIZADO** pelo fato de ser para a produção planta transgênica compreendendo introduzir em pelo menos uma célula de uma planta um vetor de expressão de acordo com a reivindicação 62, deste modo produzindo uma planta transgênica, deste modo super expressando a GA 2-oxidase de kenaf.



FIG. 1A



FIG. 1B

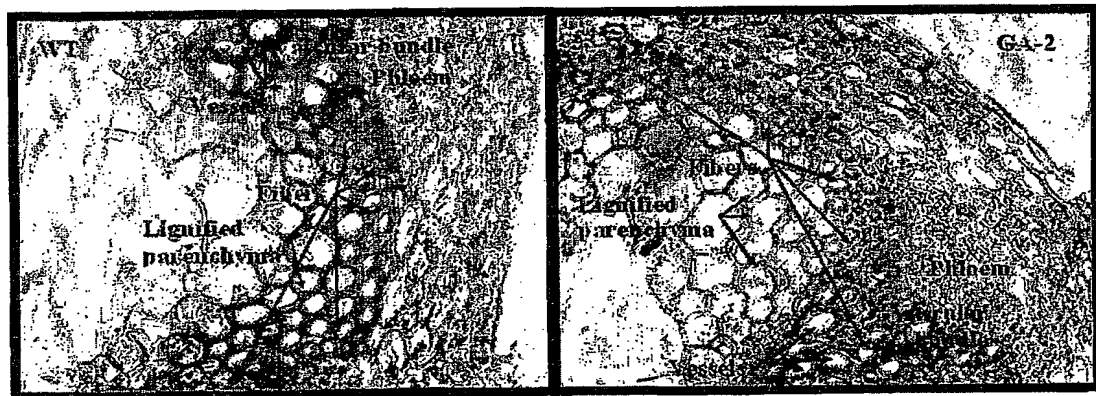


FIG. 2



FIG. 3

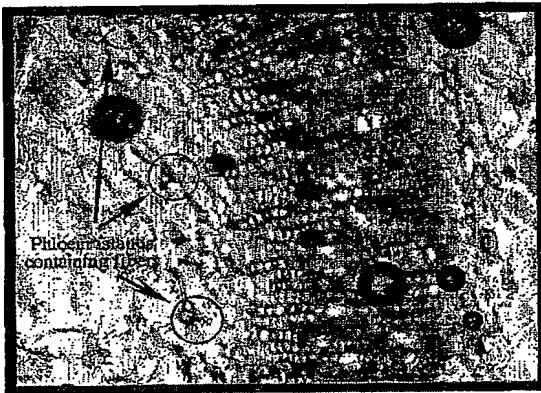


FIG. 4A

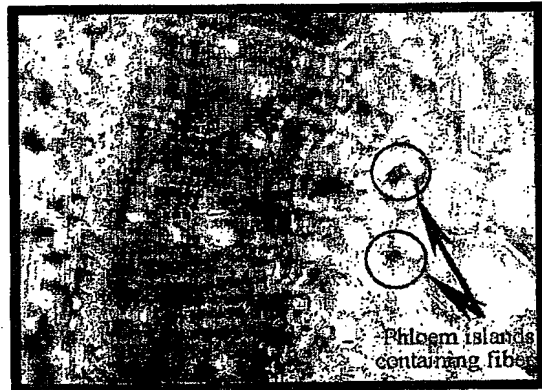


FIG. 4B



FIG. 4C

FIG. 5A



FIG. 5B



FIG. 5C

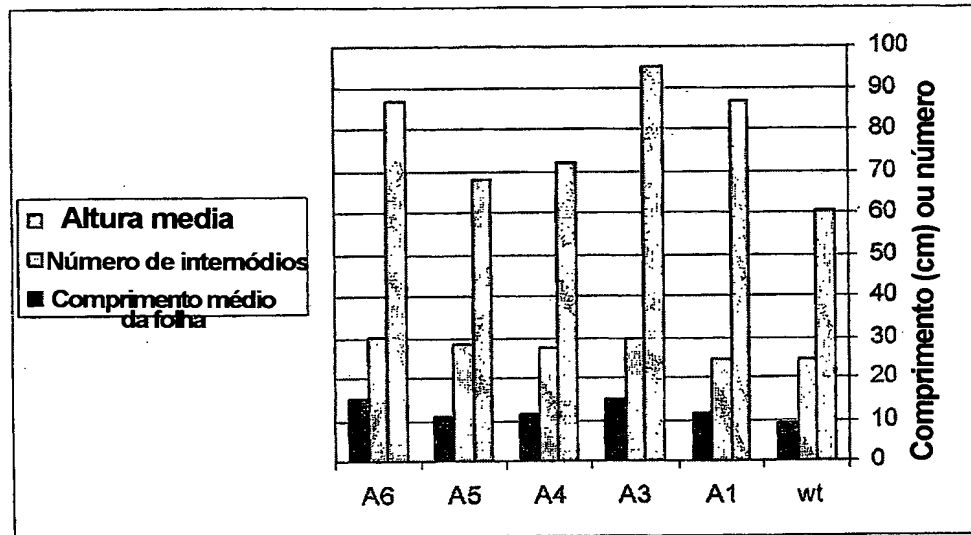


FIG. 6A

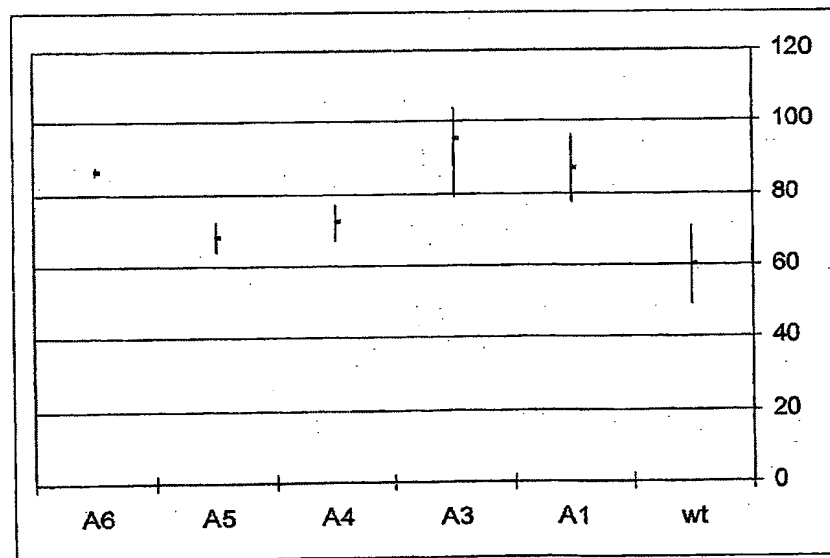


FIG. 6B

SEQÜÊNCIA GENÔMICA:

ATGGTGTTATTATCAAAACCTGGAATTGAACAGTTTTCTTATGTTAGAAACAAGC
AGCCAGCCGCATTGTTCCCTCCTCTTATCCCTATCGTAGACCTCTCCGAACCGGAT
TCCAGACACCAGATGATCAAAGCCTGCGAGGAATTCGGATTCTTCAAGGTGATC
AACCATGGGGTTCCCATGGAATTCATTTCAGGCTTGAATCCGAGGCCACCCAGT
TCTTCTCTTTACCGCTTTCCCAGAAAGAGAAAAACAGGGCAGCCCAAACCTTACGG
ATATGGCAATAGAAGGATCGGTCCCAATGGTGATGTTGGTTGGCTCGAATATCTC
CTCCTCACGACCAACCAAGACCCCAACCTCCCAACTGAAAACCCAGATGGTTTCA
GGTACCCTTTTTTTTTCTTCTTACCAGAGATAGGGAATCTGTTATCACAGCTTTT
GAAACTGTGTCTGTGTTGTTATTTTTCAGGGTAGCTTTGAATAATTATATGGCGGC
GGTGAAGAAACTGGCGTGCGAGATACTTGAAATGGTGGCGGATGGGCTAAAGAT
TCAACCTCGGAATGTGTTGAGTAAGCTGATGATGGATGAGCAGAGTGA CT CGGT
TTCAGGCTGAACCATTACCCTCCATGCCCATCGTCGAATGGAAATGTGATTGGAT
TCGGCGAACACACTGACCCACAAATCATTTCCGGTCCTAAGATCCAACAACACTTC
TGGCCTTCAAATCTCTCTAAGAGACGGCTCTTGGATTT CAGTCCCACCCGACCAC
CACTCATTTTTTCATCAATGTTGGTGATTCCCTTACAGGTAAATAATAAAAAAATT
CCTTCTTTTTTACCAACTGTGGGTCTGGTGCAAAGTGTGAGCTTGATGTTGTT CAG
GTAATGACGAATGGGAGGTTCAAAAGTGTGAAGCATAGGGTGTTGGCGAACAGT
GTGAAATCAAGGCTGTCAATGATATATTTCTGTGGACCGCCAATGAGTGAGAAG
ATAGCCCCATTGCCATGTTTGATGAGGGGAGATCAGCAAAGCTTGTACAAAGAA
TTTACATGGTTTGACTACAAAACCTCTGCTTACAACTCTAGGTTGGCAGATAACA
GGCTAATCAACTTCGAGAAAAATAGCTGCCTCATAA

FIG. 7

cDNA e seqüências de proteína

M V L L S K P G I E Q F S Y V R N K Q P
ATGGTGTTATTATCAAAACCTGGAATTGAACAGTTTTCTTATGTTAGAAACAAGCAGCCA
A A L F P P L I P I V D L S E P D S R H
GCCGCATTGTTCCCTCCTCTTATCCCTATCGTAGACCTCTCCGAACCGGATTCCAGACAC
Q M I K A C E E F G F F K V I N H G V P
CAGATGATCAAAGCCTGCGAGGAATTCCGATTCTTCAAGGTGATCAACCATGGGGTTCCC
M E F I S R L E S E A T Q F F S L P L S
ATGGAATTCATTTCCAGGCTTGAATCCGAGGCCACCCAGTTCTTCTCTTTACCGCTTTCC
Q K E K T G Q P K P Y G Y G N R R I G P
CAGAAAGAGAAAACAGGGCAGCCCAAACCTTACGGATATGGCAATAGAAGGATCGGTCCC
N G D V G W L E Y L L L T T N Q D P N L
AATGGTGATGTTGGTTGGCTCGAATATCTCCTCCTCACGACCAACCAAGACCCCAACCTC
P T E N P D G F R V A L N N Y M A A V K
CCAACTGAAAACCCAGATGGTTTTAGGGTAGCTTTGAATAATTATATGGCGGCGGTGAAG
K L A C E I L E M V A D G L K I Q P R N
AAACTGGCGTGCGAGATACTTGAAATGGTGGCGGATGGGCTAAAGATTCAACCTCGGAAT
V L S K L M M D E Q S D S V F R L N H Y
GTGTTGAGTAAGCTGATGATGGATGAGCAGAGTGACTCGGTTTTAGGCTGAACCATTAC
P P C P S S N G N V I G F G E H T D P Q
CCTCCATGCCCATCGTTCGAATGGAAATGTGATTGGATTCCGGCGAACACACTGACCCACAA
I I S V L R S N N T S G L Q I S L R D G
ATCATTTCGGTCTTAAGATCCAACAACACTTCTGGCCTTCAATCTCTCTAAGAGACGGC
S W I S V P P D H H S F F I N V G D S L
TCTTGGATTTTCACTCCACCCGACCACCACTCATTTTTTATCAATGTTGGTGATTCCTTA
Q V M T N G R F K S V K H R V L A N S V
CAGGTAATGACGAATGGGAGGTTCAAAGTGTGAAGCATAGGGTGTGGCGAACAGTGTG
K S R L S M I Y F C G P P M S E K I A P
AAATCAAGGCTGTCAATGATATATTTCTGTGGACCGCCAATGAGTGAGAAGATAGCCCCA
L P C L M R G D Q Q S L Y K E F T W F D
TTGCCATGTTTGATGAGGGGAGATCAGCAAAGCTTGTACAAAGAATTTACATGGTTTGAC
Y K T S A Y N S R L A D N R L I N F E K
TACAAAACCTTCTGCTTACAACCTCTAGGTTGGCAGATAACAGGCTAATCAACTTCGAGAAA
I A A S *
ATAGCTGCCTCATAA

FIG. 8

RESUMO

"COMPOSIÇÕES PARA SILENCIAR A EXPRESSÃO DE GIBBERELLIN 2-OXIDASE E USOS DAS MESMAS"

5 A presente invenção proporciona uma sequência de ácido nucléico isolada que codifica a enzima gibberellin 2-oxidase (GA 2-oxidase) do *Hibiscus cannabinus*. Ademais, a presente invenção proporciona métodos de silenciar a expressão do gene de GA 2-oxidase por meio de interferência de RNA para aumentar as fibras nas plantas, em particular em kenaf.