



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

(11) PI 0818534-4 B1

(22) Data do Depósito: 10/10/2008

(45) Data de Concessão: 25/09/2018



(54) Título: MÉTODOS PARA AUMENTAR A LONGEVIDADE, TAMANHO DE ÓRGÃO E/OU TAMANHO DE SEMENTE, PARA PRODUZIR UMA PLANTA COM LONGEVIDADE, TAMANHO DE ÓRGÃO E/OU TAMANHO DE SEMENTE AUMENTADO, E PARA PROLONGAR O PERÍODO DE CRESCIMENTO EM UMA PLANTA

(51) Int.Cl.: C12N 15/82; C07K 14/405; A01H 5/00

(30) Prioridade Unionista: 11/10/2007 GB 0719919.3

(73) Titular(es): PLANT BIOSCIENCE LIMITED

(72) Inventor(es): MICHAEL BEVAN; YUNHAI LI

(85) Data do Início da Fase Nacional: 09/04/2010

“MÉTODOS PARA AUMENTAR A LONGEVIDADE, TAMANHO DE ÓRGÃO E/OU TAMANHO DE SEMENTE, PARA PRODUZIR UMA PLANTA COM LONGEVIDADE, TAMANHO DE ÓRGÃO E/OU TAMANHO DE SEMENTE AUMENTADO, E PARA PROLONGAR O PERÍODO DE CRESCIMENTO EM UMA PLANTA”

Campo da Invenção

Esta invenção diz respeito a métodos de controlar o tamanho das sementes e órgãos de plantas.

Fundamentos da Invenção

O tamanho de sementes e órgãos é um traço agrônômica e ecologicamente importante que está sob o controle genético (Alonso-Blanco, C. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 4710-7 (1999); Song, X. J. Nat Genet 39, 623-30 (2007); Weiss, J. Int J Dev Biol 49, 513-25 (2005); Dinneny, J. R. Development 131, 1101-10 (2004); Disch, S. Curr Biol 16, 272-9 (2006); Science 289, 85-8 (2000); Horiguchi, G. Plant J 43, 68-78 (2005); Hu, Y Plant J 47, 1-9 (2006); Hu, Y. Plant Cell 15, 1951-61 (2003); Krizek, B. A. Dev Genet 25, 224-36 (1999); Mizukami, Y. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 942-7 (2000); Nath, U. Science 299, 1404-7 (2003); Ohno, C. K. Development 131, 1111-22 (2004); Szecsi, J. Embo J 25, 3912-20 (2006); White, D. W. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 13238-43 (2006); Horvath, B. M. Embo J 25, 4909-20 (2006); Garcia, D. Plant Cell 17, 52-60 (2005). O tamanho final das sementes e órgãos é constante dentro de uma dada espécie, ao passo que a variação de tamanho de semente e órgão interespecie é acentuadamente maior, sugerindo que as plantas têm mecanismos reguladores que controlam o crescimento de semente e órgão em uma maneira coordenada e conveniente. Apesar da importância do tamanho da semente e de órgão, entretanto, pouco é conhecido a cerca dos mecanismos moleculares e genéticos que

“MÉTODOS PARA ALTERAR O FENÓTIPO DE UMA PLANTA, PARA
 PRODUZIR UMA PLANTA E UM POLIPEPTÍDEO, PARA
 IDENTIFICAR UM POLIPEPTÍDEO, PARA AUMENTAR O TAMANHO
 DE ÓRGÃOS DE PLANTA, SEMENTES OU AMBOS, E PARA
 5 PROLONGAR O PERÍODO DE CRESCIMENTO EM UMA PLANTA,
 PLANTA, PROTEÍNA, GENES DE DA1 OU DAR ISOLADO, DA1 OU
 DAR ISOLADO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, E, VETOR”

Campo da Invenção

10 Esta invenção diz respeito a métodos de controlar o tamanho
 das sementes e órgãos de plantas.

Fundamentos da Invenção

O tamanho de sementes e órgãos é um traço agrônômica e
 ecologicamente importante que está sob o controle genético (Alonso-Blanco,
 C. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 4710-7 (1999); Song, X. J. Nat Genet 39,
 15 623-30 (2007); Weiss, J. Int J Dev Biol 49, 513-25 (2005); Dinneny, J. R.
 Development 131, 1101-10 (2004); Disch, S. Curr Biol 16, 272-9 (2006);
 Science 289, 85-8 (2000); Horiguchi, G. Plant J 43, 68-78 (2005); Hu, Y Plant
 J 47, 1-9 (2006); Hu, Y. Plant Cell 15, 1951-61 (2003); Krizek, B. A. Dev
 Genet 25, 224-36 (1999); Mizukami, Y. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 942-7
 20 (2000); Nath, U. Science 299, 1404-7 (2003); Ohno, C. K. Development 131,
 1111-22 (2004); Szecsi, J. Embo J 25, 3912-20 (2006); White, D. W. Proc
 Natl Acad Sci U S A 103, 13238-43 (2006); Horvath, B. M. Embo J 25, 4909-
 20 (2006); Garcia, D. Plant Cell 17, 52-60 (2005). O tamanho final das
 sementes e órgãos é constante dentro de uma dada espécie, ao passo que a
 25 variação de tamanho de semente e órgão interespecie é acentuadamente
 maior, sugerindo que as plantas têm mecanismos reguladores que controlam o
 crescimento de semente e órgão em uma maneira coordenada e conveniente.
 Apesar da importância do tamanho da semente e de órgão, entretanto,
 pouco é conhecido a cerca dos mecanismos moleculares e genéticos que

controlam o tamanho de órgão e semente final nas plantas.

A regulação genética do tamanho de semente tem sido investigado em plantas, incluindo no tomate, soja, milho, e arroz, usando o mapeamento de local de traço quantitativo (QTL). Até agora, na literatura publicada, dois genes (Song, X. J. Nat Genet 39, 623-30 (2007); Fan, C. Theor. Appl. Genet. 112, 1164-1171 (2006)), subjacentes a dois QTLs principais para o tamanho de grão do arroz, foram identificados, embora os mecanismos moleculares destes genes permaneçam para ser elucidados. Na *Arabidopsis*, onze locais que afetam o peso e/ou o comprimento de semente em cruzamentos entre os acessos Ler e Cvi, foram mapeados {Alonso-Blanco, 1999 supra}, mas os genes correspondentes não foram identificados. Estudos recentes têm revelado que AP2 e ARF2 estão envolvidos no controle do tamanho de semente. Infelizmente, entretanto, os mutantes ap2 e arf2 têm fertilidade inferior ao tipo selvagem (Schruff, M. C. Development 137, 251-261 (2006); Ohto, M. A. Proc. Natl. Acad. Sci USA 102, 3123-3128 (2005); Jofuku, K. D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 3117-3122 (2005)). além disso estudos usando plantas mutantes têm identificado vários reguladores positivos e negativos que influenciam o tamanho de órgão pela atuação sobre a proliferação ou expansão celulares {Krizek, B. A. Dev Genet 25, 224-36 (1999); Mizukami, Y. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 942-7 (2000); Nath, U. Science 299, 1404-7 (2003); Ohno, C. K. Development 131, 1111-22 (2004); Szecsi, J. Embo J 25, 3912-20 (2006); White, D. W. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 13238-43 (2006); Horvath, B. M. Embo J 25, 4909-20 (2006); Garcia, D. Plant Cell 17, 52-60 (2005). Horiguchi, G. Plant J 43, 68-78 (2005); Hu, Y. Plant J 47, 1-9 (2006) Dinneny, J. R. Development 131, 1101-10 (2004)).

A identificação de um fator ou fatores que controlam o tamanho final tanto de sementes quanto de órgãos não apenas ajudará a conhecer melhor os mecanismos do controle de tamanho em plantas, mas também pode ter aplicações práticas substanciais por exemplo na melhora de

rendimento de safra e biomassa de planta para a geração de biocombustível.

Sumário da Invenção

Os presentes inventores identificaram uma Proteína contendo os domínios UIM e LIM (chamada de DA1) que é um regulador chave no controle do tamanho final de sementes e órgãos pela restrição da duração do crescimento proliferativo. Um alelo (chamado de alelo da1-1) é aqui mostrado atuar como uma mutação interferente negativa dominante para as proteínas relacionadas com DARs ou DA1. A super expressão do gene mutante da1-1 (R358K) no tipo selvagem causa um aumento no tamanho da semente e de órgão em plantas do tipo selvagem, indicando que o alelo da1-1 interfere com DARs em uma maneira dependente da dosagem. As mutações que reduzem ou abolem a função de EOD1/BB, que codifica uma E3 ubiquitina ligase, sinergisticamente realçam os fenótipos de da1-1, indicando que EAI atua em paralelo com EOD1/BB para limitar o tamanho de sementes e órgãos. A caracterização funcional de DAI e EOD1/BB fornece discernimento no mecanismo de controle do tamanho final da semente e de órgão e pode ser uma ferramenta valiosa para melhorar o rendimento de safra e aumento da biomassa de planta.

Aspectos da invenção fornecem uma proteína isolada que é DA1 e um ácido nucleico isolado que codifica uma proteína que é DA1. Também são fornecidas proteínas relacionadas com DA1 e que codificam ácido nucleico. As proteínas de DA1 e relacionadas com DA1 (DARs) são coletivamente aqui aludidas como proteínas DA.

Outros aspectos da invenção fornecem uma proteína isolada (DA1R358K) que interfere com a função da proteína de DA1 e proteínas relacionadas com DA1 e um ácido nucleico isolado que codifica uma tal proteína.

Um outro aspecto da invenção fornece um método para produzir plantas tendo fertilidade normal mas que tenham uma ou mais

características selecionadas de longevidade maior, tamanho de órgão ampliado, tamanho de semente ampliado.

Um outro aspecto da invenção fornece uma planta tendo fertilidade normal mas que tem uma característica selecionada de longevidade mais longa, tamanho de órgão ampliado, tamanho de semente ampliado, e combinações destas características

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 mostra que *dal-1* tem sementes e órgãos grandes. (A e B) sementes secas de Col-0 (A) e *dal-1* (B). (C e D) Embriões maduros de Col-0 (C) e *dal-1* (D). (E e F) mudas de 9 dias de idade de Col-0 (E) e *dal-1* (F). *dal-1* tem cotilédones maiores do que WT. (G) As quintas folhas de Col-0 (esquerda) e *dal-1* (direita). *dal-1* tem folhas maiores e mais redondas comparadas com o tipo selvagem Col-0. (H e I) as flores de Col-0 (H) e *dal-1* (I). (J e K) Silíquas de Col-0 (J) e *dal-1* (K). (L) Peso de semente médio de Col-0, *dal-1*, *dal-ko1*, *dar1-1*, e *dal-ko1dar1-1* é dado em mg por 100 sementes. Os desvios padrão (SD) são mostrados (n = 5). As plantas foram cultivadas sob condições idênticas. (M-0) diâmetro de haste (M), número de célula epidérmica em seções transversais de haste (N), e área de pétala (O) de Col-0, *dal-1*, DA1COM#2, e 35S::DA1^{R3581c}#5. (P e Q) Massa de 5 flores frescas (estágio 14) (P) e folhas (1^a a 7^a) de plantas de 35 dias de idade (Q). (R) Área celular de embriões (E), pétalas (P) e folhas (L) em Col-0 e *dal-1*. Os valores são dados como média ± SD em relação ao respectivo valor do tipo selvagem, ajustado a 100 %. (S) Níveis de expressão relativa de DA1 em Col-0 e 35S::DA1^{R3581} as mudas foram medidas pela RT-PCR em tempo real quantitativa. Barras de escala: 200 µm (A e B), 100 µm (C e D), 1 mm (E e F), 0,5 cm (G), 1 mm (H a K).

A Figura 2 mostra a análise cinemática do crescimento de pétala e folha. (A) Crescimento de pétalas mutantes Col-0 e *dal-1*. As pétalas maiores de cada série são de flores abertas (estágio 14). (B) Índice Mitótico

em pétalas WT e mutantes *dal-1*. O eixo do tempo em (B) corresponde àquele em (A). (C) Crescimento da quinta folha de Col-0, *dal-1*, DA1COM#2, e 35S::DA1^{R358K}#5 com o tempo. DAE é dias depois da emergência.

A Figure 3 mostra a identificação e expressão do gene DA1.

5 (A) estrutura do gene DA1, mostrando os sítios mutados dos alelos *dal-1*, *soda-1*, *soda-2*, e *soda-3*. O códon de partida (ATG) e o códon de parada (TGA) são indicados. As caixas fechadas indicam a sequência codificadora e as linhas entre as caixas indicam introns. Os sítio de inserção de T-DNA (*dal-ko1*, *dal-ko2* e *dal-ko3*) nos genes DA1 são mostrados. (B a G) atividade

10 promotora de DA1 monitorada pela expressão de transgene pDA1::GUS. O tingimento de GUS nas mudas (B e C), um embrião (D), raízes (E), e pétalas (F e G). (H e I) As flores de Col-0 (H) e mutante duplo *dal-ko1dal-1* (I). (J) Silíquas de Col-0 (esquerda) e mutante duplo *dal-ko1dal-1* (direita). (K) Área de pétala de Col-0, mutantes duplos *dal-ko1*, *dar1-1*, *dal-ko1dar1-1*. O

15 mutante duplo *dal-ko1dal1-1* demonstra um fenótipo *dal-1* incluindo flores e pétalas grandes, silíquas amplas e achatadas, e estilos curtos. (L) A análise de RT-PCR quantitativa revelou que a expressão de DA1 é lentamente induzida por ABA. Mudanças WT de 7 dias de idade foram tratadas com 10 µm de ABA por 2, 4, 6, 18 e 30 horas. (M e N) Sementes Col-0 e *dal-1-1* tipo selvagem

20 foram cultivados em meio MS com 2 µm de ABA sob condições de luz constantes. O mutante *dal-1* (N) exibe o estabelecimento de mudas insensíveis a ABA comparadas com Col-0 tipo selvagem (M). (O) mudas de 4 dias de idade de Col-0 (esquerda), *dal-1* (centro) e DA1COM #2 (direita) foram transferidas para o meio MS com 5 µm de ABA por 3 semanas. As

25 mudas de *dal-1* mutantes continuam a crescer na presença de níveis baixos de ABA que inibem o crescimento de mudas Col-0 do tipo selvagem. Barras de escala: 1 mm (B, H, I, M, e N), 50 µm (D e E), 0,5 mm (C e J), 0,1 mm (F e G), 0,5 cm (O).

A Figura 4 mostra mutações em EOD1/BB sinergisticamente

realçam os fenótipos de *dal-1*. (A) Flores de Col-0, *dal-1*, *eodl-2* e *eodl-2dal-1* mutantes duplos. (B) Plantas que crescem no solo de Col-0, *eodl-2*, *eodl-2* e *eodl-2dal-1* mutantes duplos. (C) Peso de semente médios de Col-0, *dal-1*, *eodl-2* e *eodl-2dal-1* mutantes duplos são mostrados como mg por 100 sementes. Os desvios padrão são mostrados ($n = 5$). As plantas foram cultivadas sob condições idênticas. (D) Área de pétala de Col-0, *dal-1*, *eodl-2* e *eodl-2dal-1* mutante duplo. Os valores de desvio padrão são mostrados ($n > 50$), (E) Um modelo de DAI e EOD1/BB no controle do tamanho da semente e de órgão. Barras de escala: 2 mm (A), 50 mm (B).

10 A Figura 5 mostra que *dal-1* tem sementes grandes. Os lotes pré pesados de Col-0 tipo selvagem (A), *dal-1* (B), DA1COM#2 (C), 35S::DA1^{R3581}45 (D), e sementes mutantes *dal-ko1darl-1* de plantas individuais foram passadas através de uma série de peneiras de arame de tamanho de malha decrescente (em μm) como descrito em Métodos
15 Suplementares. (E) O peso de semente médio por planta. Os valores de desvio padrão foram dados ($n = 5$). As plantas foram cultivadas sob condições idênticas.

A Figura 6 mostra o desenvolvimento de semente em plantas tipo selvagem e *dal-1*. (A a L), óvulos limpos (A, B) e sementes (C a L) do tipo selvagem (A, C, E, G, I e K), e *dal-1* (B, D, F, H, J e L) retratados com
20 ópticas de contraste diferenciais. Barras de escala: 50 μm (A a L).

A Figura 7 mostra que a planta *dal-1* tem flor grande com pétalas extras e silíqua deformada com carpelos extras. (A) Flor do tipo selvagem. (B e C) Flores *dal-1* com pétalas extras. (D) Silíqua tipo selvagem,
25 (E a G) silíquas *dal-1* com carpelos extras. Barras de escala: 1 mm (A a C), 2 mm (D a G).

A Figura 8 mostra que o mutante *dal-1* tem a proliferação de célula prolongada. (A e B) pCyclinB1::GUS atividade nas primeiras folhas (9 dias depois da germinação) de mudas tipo selvagem (A) e *dal-1* (B)

cultivadas em meio MS contendo 1 % de glicose. (C) O nível de expressão de gene SAG12 na quinta das folhas de plantas Col-0 tipo selvagem e *dal-1* foi detectado pelo uso da análise de RT-PCR em tempo real quantitativa. DAE é dias depois da emergência.

5 A Figura 9 mostra a clonagem com base no mapa de clonagem de DAI. (A) Mapeamento fino do local DA1. O local DA1 foi mapeado para o cromossoma 1 (Chr 1) entre os marcadores T16N11 e CER451450. O local DA1 foi ainda estreitado para uma região de DNA genômico de 30 kb entre os marcadores T29M8-26 e F18014-52 e co-segregaram com o marcador
10 CAPS DA1CAPS. O número de recombinantes identificados a partir das plantas F2 é mostrado. (B) A mutação em *dal-1* foi identificada usando o marcador de CAPS DA1CAPS1. (C a E) Níveis de expressão de DA1 (C) e DAR1 (D) em linhagens do tipo selvagem e T-DNA foram revelados pela análise de RT-PCR.

15 A Figura 10 mostra a identificação de proteínas relacionadas com DA1 em *Arabidopsis* e homólogos de DA1 em outras espécie. As proteínas relacionadas com DA1 em *Arabidopsis* são mostradas na Figura 10A e as proteínas relacionadas com DA1 em outra espécie são mostradas na Figura 10B.

20 A Figura 11 mostra que a mutação R358K em DA1 é responsável pelo tamanho da semente e de órgão aumentado. (A) Área de pétala de Col-0, *dal-1*, *dal-ko1*, *dal-ko2*, *dal-ko3*, *dal-1/Col-0* F₁, *dal-ko1/dal-1* F₁, *dal-ko2/dal-1* F₁, *dal-ko3/dal-1* F₁, *dal-ko1/Col-0* F₁, *dal-ko2/Col-0* F₁, *dal-ko3/Col-0* F₁, e *dal-ko1/dal-1* F₁. Os valores de desvio
25 padrão são dados (n > 50). (B) O peso de semente médio de Col-0, *dal-1*, *dal-ko1*, *dal-ko1/dal-1* F₁, e *dal-ko1/Col-0* F₁ é dado em mg por 100 sementes. Os valores de desvio padrão são dados (n = 5). As plantas foram cultivadas sob condições idênticas.

A Figura 12 mostra que as mutações em um realçador de *dal-1*

(EOD1/BB) sinergisticamente realçam os fenótipos de semente e órgão grandes de *dal-1*. (A) O *eod1-1dal-1* mutante duplo tem um peso de semente aumentado comparado com *dal-1*. Peso de semente médio de *dal-1* e *eod1-1dal-1* mutante duplo é dado em mg por 100 sementes. Os valores de desvio padrão são mostrados ($n = 5$). As plantas foram cultivadas sob condições idênticas. (B) O mutante duplo *eod1-1dal-1* tem flor maior do que *dal-1*. (C) a estrutura de gene EOD1/BB, mostrando os sítios mutados dos dois alelos *eod1*. O códon de partida (ATG) e o códon de parada (TGA) são indicados. As caixas fechadas indicam a sequência codificadoras e as linhas entre as caixas indicam introns. O sítio mutado em *eod1-1* e o sítio de inserção de T-DNA em *eod1-2* também são mostrados. (D) Plantas de oito semanas de idade de Col-0, *dal-1*, *eod1-2*, e *eod1-2dal-1* são mostradas. A planta *eod2-1dal-1* tem um período de cultivo mais longo do que a *dal-1*. (E) Plantas de oito semanas de idade de Ler, *dal-1*^{Ler}, *bb-1*, e *bb-1dal-1*^{Ler} são mostradas. A planta *bb-1dal-1*^{Ler} tem um período de cultivo mais longo do que a *dal-1*^{Ler}. Barras de escala: 1 mm (B), 5 cm (D e E). (F) Área de pétalas de Ler, *dal-1*^{Ler}, *bb-1*, e *bb-1dal-1*^{Ler} mutante duplos. Valores de desvio padrão são mostrados ($n > 50$). Mutações em BB sinergisticamente realçam o fenótipo de tamanho de pétala de *dal-1*, sugerindo que DA1 e BB atuam em caminhos paralelos.

A Figura 13 mostra que a análise genética entre *dal-1* e *ant-5*, *axr1-12*, *ap2-7*, e *arf2-7*. (A e B) O fenótipo de tamanho de pétala de *ant5dal-1*^{Ler} e *axr1-12dal-1* mutante duplo é essencialmente aditivo, comparado com as suas linhagens precursoras. (C e D) O fenótipo de tamanho de semente de *ap2-7dal-1* e *arf2-7dal-1* mutante duplos é também essencialmente aditivo, comparado com as suas linhagens precursoras.

A Figura 14 mostra uma análise filogenética de proteínas equivalentes a DA1. Gráfico esquerdo: Uma árvore filogenética de matriz de distância foi criada usando o software PHYLIP (VERSÃO 3.66) com os parâmetros pré-determinados (o modelo JTT de evolução de sequência de

proteína e o algoritmo de união de vizinho). A árvore foi depois importada no software MEGA 4.0 para rearranjo. Os valores de comando de entrada (os números dos ramos indicam o número de vezes da partição da espécie nos dois conjuntos que são separados por aquele ramo ocorrido entre as árvores, apenas mostrados em 70) foram obtidos por 100 réplicas. Os dados para a árvore foi a região de 250 aminoácidos do terminal C das sequências de proteína equivalente a DA1 de tamanho natural. O gráfico da direita mostra uma visão geral simplificada da evolução da planta com base na árvore hiperbólica apresentada em (<http://ucjeps.berkeley.edu/TreeofLife/hyperbolic.php>). Os clados que são relacionados com o texto são retidos no gráfico. As espécies que foram analisadas são sublinhadas.

A Figure 15 (A-D) mostra silíquas de Col-0, BrDA1aCOM (linhagem transgênica 35S::BrDA1a), OsDA1COM (linhagem transgênica 35S::OsDA1) e da1-1. (E-H) folhas Roseta de Col-0, da1-1, BrDA1bCOM (linhagem transgênica 35S::BrDA1b) e 35S::BrDA1a^{R/K} (super expressam 35S::BrDA1a^{R/K} em Col-0). (I) estrutura do gene DA1 mostrando os sítios mutados de da1-1 e sítios de inserção de T-DNA (da1-ko1, da1-ko2 e da1-ko3).

Descrição Detalhada das Formas de Realização da Invenção

Em vários aspectos, a invenção fornece polipeptídeos DA isolados codificados pelos genes DA e sequências de ácido nucleico aqui descritos.

Os polipeptídeos DA incluem tanto polipeptídeos DA-1 quanto polipeptídeos relacionados com DA-1 (DAR), e seus homólogos funcionais, como aqui descritos.

Os polipeptídeo DAs, incluindo os polipeptídeos DA-1 e os polipeptídeos relacionados com DA-1 (DAR), possuem uma estrutura de domínio característica.

Um polipeptídeo DA pode compreender um domínio UIM1 e

um domínio UIM2. Um domínio UIM1 pode consistir da sequência da SEQ ID NO: 3 e um domínio UIM2 pode consistir da sequência da SEQ ID NO: 4.

p---pLpbAl pb.Sbp-.pp p (SEQ ID NO: 3)

p---pLpbAl pb.Sbp-spp p (SEQ ID NO:4)

5

em que:

p é um resíduo de aminoácido polar, por exemplo, C, D, E, H, K, N, Q, R, S ou T;

b é um resíduo de aminoácido grande, por exemplo, E, F, H, I, K, L, M, Q, R, W ou Y;

10

s é um resíduo de aminoácido pequeno, por exemplo, A, C, D, G, N, P, S, T ou V;

l é um resíduo de aminoácido alifático, por exemplo, I, L ou V;

. é ausente ou é qualquer aminoácido, e

- é qualquer aminoácido.

15

Os exemplos de sequências de domínio UIM1 e UIM2 adequados são apresentados abaixo. Outros exemplos de sequências de domínio UIM1 e UIM2 podem ser identificados usando técnicas de análise de sequência padrão como aqui descritas (por exemplo, Simple Modular Architecture Research Tool (SMART); EMBL Heidelberg, DE).

20

Um polipeptídeo DA pode compreender um domínio LIM. Um domínio LIM pode consistir da sequência da SEQ ID NO: 5;

pCs.Cscslh s bhlp tb.sp.aH.. .pCFpCs..p CppsLss...
.p.ab.pcsp baCpps... (SEQ ID NO: 5)

em que:

25

c é um resíduo de aminoácido carregado, por exemplo, D, E, H, K, R;

p é um resíduo de aminoácido polar, por exemplo, C, D, E, H, K, N, Q, R, S ou T;

h é um resíduo de aminoácido hidrofóbico, por exemplo, A, C,

F, G, H, I, L, M, T, V, W e Y;

t é um resíduo de aminoácido minúsculo, por exemplo, A, G ou S;

a é um resíduo de aminoácido aromático, por exemplo, F, H,

5 W ou

Y.;

b é um resíduo de aminoácido grande, por exemplo, E, F, H, I, K, L, M, Q, R, W ou Y;

s é um resíduo de aminoácido pequeno, por exemplo, A, C, D,

10 G, N, P, S, T ou V;

l é um resíduo de aminoácido alifático, por exemplo, I, L ou V;

. é ausente ou é qualquer aminoácido; e

- é qualquer aminoácido.

Os exemplos de sequências de domínio LIM adequados são
15 apresentados abaixo. Outros exemplos de sequências de domínio LIM podem ser identificados usando técnicas de análise de sequência padrão (por exemplo, Simple Modular Architecture Research Tool (SMART); EMBL Heidelberg, DE).

Um polipeptídeo DA pode compreender uma região de
20 terminal de carboxila tendo pelo menos 20 %, pelo menos 30 %, pelo menos 40 %, pelo menos 50 %, pelo menos 60 %, pelo menos 70 %, pelo menos 80 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 % ou pelo menos 98 % de identidade de aminoácido para os resíduos de 250 a 532 da SEQ ID NO: 1 que definem o domínio de terminal C de DA1.

25 Um polipeptídeo DA pode compreender ainda R em uma posição equivalente à posição 358 da SEQ ID NO: 1.

Uma posição em uma sequência de aminoácido que é equivalente à posição 358 da SEQ ID NO: 1 pode ser facilmente identificada usando ferramentas de análise de sequência padrão. Os exemplos de

sequências com um resíduo R em uma posição equivalente à posição 358 da SEQ ID NO: 1 são aqui mostrado em outro lugar.

Em algumas formas de realização preferidas, um polipeptídeo DA pode compreender:

- 5 um domínio UIM da SEQ ID NO: 3
- um domínio UIM da SEQ ID NO: 4
- um domínio LIM da SEQ ID NO: 5, e
- uma região de terminal C tendo pelo menos 20 % de
- identidade de sequência com os resíduos de 250 a 532 da SEQ ID NO: 1.

- 10 Um polipeptídeo DA preferido pode compreender ainda R em
- uma posição equivalente à posição 358 da SEQ ID NO: 1.

- Por exemplo, um polipeptídeo DA pode compreender uma
- sequência de aminoácido apresentada em uma entrada de base de dados
- selecionada do grupo que consiste de SGN-U317073, SGN-U277808, SGN-
- 15 U325242, AT4G36860, SGN-U209255, AB082378,1, AT2G39830,
- CAN69394,1, OSO3G16090, 9234.M000024, 29235.M000021, AT5G66620,
- AT5G66630, AT5G66610, AT5G66640, AT5G17890, SGN-U320806,
- AB096533,1, CAL53532,1, OSO6G08400, SGNU328968, OS03G42820 e
- OS12G40490 ou pode ser variante ou um fragmento de uma destas
- 20 sequências que retém atividade de DA.

- Um polipeptídeo DA pode compreender uma sequência de
- aminoácido de AtDA1, AtDAR1, AtDAR2, AtDAR3, AtDAR4, AtDAR5,
- AtDAR6, AtDAR7, BrDA1a, BrDA1b, BrDAR1, BrDAR2, BrDAR3-7,
- BrDAL1, BrDAL2, BrDAL3, OsDA1, OsDAR2, OsDAL3, OsDAL5,
- 25 PpDAL1, PpDAL2, PpDAL3, PpDAL4, PpDAL5, PpDAL6, PpDAL7,
- PpDAL8, SmDAL1 e SmDAL2 (como mostrado no Alinhamento E).

Outros exemplos de entradas de base de dados de sequências de polipeptídeos DA são mostrados na Tabela 6 e Tabela 11. Outras sequências de polipeptídeo DA que incluem as características apresentadas

acima podem ser identificadas usando ferramenta de análise de sequência padrão.

Em algumas formas de realização preferidas, um polipeptídeo DA pode compreender a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 (AT1G19270; NP_173361.1 GI: 15221983) ou pode ser um fragmento ou variante desta sequência que retém atividade de DA.

Um polipeptídeo DA que é uma variante de uma sequência DA de referência, tal como a SEQ ID NO: 1 ou uma sequência mostrada no alinhamento E, pode compreender uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 20 %, pelo menos 30 %, pelo menos 40 %, pelo menos 50 %, pelo menos 60 %, pelo menos 70 %, pelo menos 80 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 % ou pelo menos 98 % de identidade de sequência com a sequência de referência.

Um polipeptídeo DA que é uma variante da SEQ ID NO: 1 pode compreender um domínio UIM1 tendo a sequência QENEDIDRAIALSLLEENQE (SEQ ID NO: 6) e um domínio UIM2 tendo a sequência DEDEQIARALQESMVVGNSP (SEQ ID NO: 7).

Um polipeptídeo DA que é uma variante da SEQ ID NO: 1 pode compreender um domínio LIM tendo a sequência:
ICAGCNMEIGHGRFLNCLNSLWHPECFRCYGCSPQISEYEFSTSGNYPF
HKAC (SEQ ID NO: 8)

As variantes de sequência de aminoácido particulares podem diferir do polipeptídeo DA-1 da SEQ ID NO: 1 pela inserção, adição, substituição ou deleção de 1, 2, 3, 4, 5 a 10, 10 a 20, 20 a 30, 30 a 50 aminoácidos ou mais do que 50 aminoácidos.

A similaridade e identidade de sequência são habitualmente definidas com referência ao algoritmo GAP (Wisconsin Package, Accelrys, San Diego USA). GAP usa o algoritmo de Needleman e Wunsch para alinhar duas sequências completas que maximiza o número de emparelhamentos e

minimiza o número de intervalos. No geral, parâmetros de default são usados, com uma penalidade de criação de intervalo = 12 e penalidade de extensão de intervalo = 4.

O uso de GAP pode ser preferido mas outros algoritmos
 5 podem ser usados, por exemplo, BLAST (que usa o método de Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (que usa o método de Pearson e Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448) ou o algoritmo de Smith-Waterman (Smith e Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197) ou o programa TBLASTN, de Altschul *et al.* (1990) supra, no geral utilizando
 10 parâmetros de default. Em particular, o algoritmo de psi-Blast (Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389-3402) pode ser usado.

A comparação de sequência pode ser feita no tamanho natural da sequência relevante aqui descrita.

Em vários aspectos, a invenção fornece genes de DA e
 15 sequências de ácido nucleico que codificam polipeptídeos DA, como aqui descritos.

Por exemplo, um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo DA pode compreender uma sequência de nucleotídeo apresentada em uma entrada de base de dados selecionada do grupo que consiste de SGN-
 20 U317073, SGN-U277808, SGN-U325242, AT4G36860, SGN-U209255, A3082378,1, AT2G39830, CAN69394,1, OS03G16090, 9234.M000024, 29235.M000021, AT5G66620, AT5G66630, AT5G66610, AT5G66640, AT5G17890, SGN-U320806, AB096533,1, CAL53532,1, 05O6G08400, SGN-U328968, OS03G42820 e OS12G40490 ou pode ser variante ou um
 25 fragmento de uma destas sequências.

Outras entradas de base de dados de sequências de ácido nucleico que codificam polipeptídeos DA são mostradas na Tabela 7.

Em algumas formas de realização preferidas, um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo DA pode compreender a sequência de

nucleotídeo da SEQ ID NO: 2 ou qualquer uma das SEQ ID NOS: 11 a 16 ou pode ser uma variante ou fragmento desta sequência que codifica um polipeptídeo que retém atividade de DA.

5 Uma sequência variante pode ser um mutante, homólogo ou alelo de uma sequência DA de referência, tal como a SEQ ID NO: 2; qualquer uma das SEQ ID NOS: 11 a 16; ou uma sequência tendo uma entrada de base de dados apresentada acima, e pode diferir da sequência DA de referência em uma ou mais de adição, inserção, deleção ou substituição de um ou mais nucleotídeos no ácido nucleico, levando à adição, inserção, deleção ou
10 substituição de um ou mais aminoácidos no polipeptídeo codificado. Naturalmente, mudanças para o ácido nucleico que não fazem nenhuma diferença para a sequência de aminoácido codificada são incluídos. Um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo DA pode compreender uma sequência tendo pelo menos 20 % ou pelo menos 30 % de identidade de sequência com
15 a sequência de ácido nucleico DA de referência, preferivelmente pelo menos 40 %, pelo menos 50 %, pelo menos 60 %, pelo menos 65 %, pelo menos 70 %, pelo menos 80 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 % ou pelo menos 98 %. A identidade de sequência é descrita acima.

20 Um fragmento ou variante pode compreender uma sequência que codifica um polipeptídeo DA funcional isto é, um polipeptídeo que retém uma ou mais características funcionais dos polipeptídeos codificados pelo gene DA do tipo selvagem, por exemplo, a capacidade para modular a duração do crescimento proliferativo.

25 Um ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleotídeo que é uma variante de uma sequência de ácido nucleico DA de referência, tal como a SEQ ID NO: 2 ou qualquer uma das SEQ ID NOS: 11 a 16, pode seletivamente hibridizar sob condições de severidade com esta sequência de ácido nucleico ou o seu complemento.

As condições severas incluem, por exemplo, para hibridização

de sequências que são de cerca de 80 a 90 % idênticas, hibridização durante a noite a 42° C em Na₂HPO₄ 0,25 M, pH 7,2, 6,5 % de SDS, 10 % de sulfato de dextrano e uma lavagem final a 55° C em 0,1X SSC, 0,1 % de SDS. Para a detecção de sequências que são maiores do que cerca de 90 % idênticas, as condições adequadas incluem hibridização durante a noite a 65° C em Na₂HPO₄ 0,25 M, pH 7,2, 6,5 % de SDS, 10 % de sulfato de dextrano e uma lavagem final a 60° C em 0,1X SSC, 0,1 % de SDS.

Uma alternativa, que pode ser particularmente apropriada com preparações de ácido nucleico de planta, é uma solução de 5x SSPE (final NaCl 0,9 M, fosfato de sódio 0,05 M, EDTA 0,005 M pH 7,7), 5X solução de Denhardt, 0,5 % de SDS, a 50° C ou 65° C durante a noite. As lavagens podem ser realizadas em 0,2x SSC/0,1 % de SDS a 65° C ou de 50 a 60° C em 1x SSC/0,1 % de SDS, como requerido.

Os ácidos nucleicos como aqui descritos podem ser total ou parcialmente sintéticos. Em particular, eles podem ser recombinantes em que as sequências de ácido nucleico que não são encontradas juntas na natureza (não ficam contiguamente) foram ligadas ou de outro modo artificialmente combinadas. Alternativamente, elas podem ter sido sintetizadas diretamente por exemplo, usando um sintetizador automatizado.

O ácido nucleico naturalmente pode ser de filamento duplo ou simples, cDNA ou DNA genômico ou RNA. O ácido nucleico pode ser total ou parcialmente sintético, dependendo do projeto. Naturalmente, a pessoa habilitada entenderá que onde o ácido nucleico inclui RNA, referência à sequência mostrada deve ser interpretada como referência ao equivalente de RNA, com U substituído no lugar de T.

Em vários aspectos, a invenção fornece polipeptídeos DA dominantes negativos e que codificam ácidos nucleicos. Um polipeptídeo DA dominante negativo pode aumentar um ou mais de tamanho de órgão, tamanho de semente ou longevidade sem afetar a fertilidade, na expressão em

uma planta.

Um alelo negativo dominante de um polipeptídeo DA pode compreender um polipeptídeo DA tendo uma mutação, por exemplo, uma substituição ou deleção, em uma posição equivalente à posição 358 da SEQ ID NO: 1.

Por exemplo, um alelo negativo dominante de um polipeptídeo DA pode compreender uma mutação do resíduo R conservado em uma posição equivalente à posição 358 da SEQ ID NO: 1. Em formas de realização preferidas, o resíduo R conservado pode ser substituído no lugar de K. A posição R358 da SEQ ID NO: 1 está localizada dentro da região conservada de terminal C (aminoácidos 250 a 532 da SEQ ID NO: 1). Um resíduo R em uma posição em uma sequência de polipeptídeo DA que é equivalente à posição 358 da SEQ ID NO: 1 pode ser identificado alinhando-se estas regiões conservadas de terminal C usando análise de sequência padrão e ferramentas de alinhamento.

O ácido nucleico que codifica um alelo negativo dominante de uma proteína DA pode ser produzido por qualquer técnica conveniente. Por exemplo, a mutagênese loco dirigida pode ser utilizada em um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo DA para alterar o resíduo R conservado na posição equivalente a R358 na SEQ ID NO: 1, por exemplo para K. Reagentes e kits para a mutagênese *in vitro* são comercialmente disponíveis. O ácido nucleico mutado que codifica o alelo negativo dominante de uma proteína DA e pode ser ainda clonado em um vetor de expressão e expressado em células de planta como descrito abaixo para alterar fenótipo de planta.

O ácido nucleico que codifica o polipeptídeo DA pode ser expressado na mesma espécie ou variedade de planta a partir da qual o mesmo foi originalmente isolado ou em uma espécie ou variedade de planta diferente (isto é, uma planta heteróloga).

“Heterólogo” indica que o gene/sequência de nucleotídeos em

questão ou uma sequência que regula o gene/sequência em questão, foram introduzidos dentro das ditas células da planta ou um ancestral desta, usando engenharia genética ou meios recombinantes, isto é, pela intervenção humana. As sequências de nucleotídeo que são heterólogas para uma célula de planta

5 podem não ser de ocorrência natural em células deste tipo, variedade ou espécie (isto é, exógena ou estranha) ou pode ser sequências que não são de ocorrência natural em que o ambiente sub-celular ou genômico das células ou pode ser sequências que não são naturalmente reguladas nas células isto é, operavelmente ligadas a um elemento regulador não natural. “Isolado” indica

10 que a molécula isolada (por exemplo, polipeptídeo ou ácido nucleico) existe em um ambiente que é distinto do ambiente no qual o mesmo ocorre na natureza. Por exemplo, um ácido nucleico isolado pode ser substancialmente isolado com respeito ao ambiente genômico no qual o mesmo naturalmente ocorre. Um ácido nucleico isolado pode existir em um ambiente outro que não

15 o ambiente no qual o mesmo ocorre na natureza.

Um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo DA como aqui descrito pode ser operavelmente ligado a uma sequência reguladora heteróloga, tal como um promotor, por exemplo um promotor constitutivo, indutível, específico de tecido ou específico de desenvolvimento.

20 Muitas sequências reguladoras adequadas são conhecidas na técnica e podem ser usadas de acordo com a invenção. Os exemplos de sequências reguladoras adequadas podem ser derivadas de um vírus de planta, por exemplo o promotor do gene do Vírus Mosaico da Couve Flor 35S (CaMV 35S) que é expressado em um nível alto virtualmente em todos os

25 tecidos de planta (Benfey *et al*, (1990) EMBO J 9: 1677-1684). Outros elementos reguladores constitutivos adequados incluem o promotor 19S do vírus mosaico da couve flor; o Promotor do vírus mosaico da escrofulária; e promotor do gene da nopalina sintase (nos) (Singer *et al.*, Plant Mol. Biol. 14: 433 (1990); An, Plant Physiol. 81: 86 (1986)).

As construções para a expressão dos genes DA sob o controle de um promotor constitutivo forte (o promotor 35S) são exemplificados abaixo mas aqueles habilitados na técnica avaliarão que uma ampla variedade de outros promotores pode ser utilizada com vantagem em contextos particulares.

Um promotor específico de tecido pode ser utilizado para expressar a forma negativa dominante do polipeptídeo DA em um órgão ou tecido específicos para aumentar o tamanho deste tecido ou órgão em relação aos tecidos ou órgãos nos quais o promotor específico de tecido não é ativo e a forma negativa dominante do polipeptídeo DA não é expressada. Por exemplo, para aumentar o tamanho de sementes, a forma negativa dominante do polipeptídeo DA pode ser preferencialmente expressada em tecido de semente, usando um promotor específico de semente. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser expressado integumento em desenvolvimento usando um promotor específico de integumento tal como o promotor INO (Meister R. M., Plant Journal 37: 426-438 (2004)) ou em embriões usando um promotor específico de embrião tal como o promotor H4 da histona (Devic M. Plant Journal 9; 205-215 (1996)).

Alternativamente ou além disso, poder-se-ia selecionar um promotor indutível. Deste modo, por exemplo, a forma negativa dominante do polipeptídeo DA pode ser expressada em tempos ou lugares específicos de modo a se obter mudanças desejadas no crescimento de órgão. Promotores indutíveis que incluem o sistema de expressão de gene AlcA indutível em álcool (Roslan *et al.*, Plant Journal; Out de 2001; 28(2): 225-35) podem ser utilizados.

O ácido nucleico DA pode estar contido em uma construção de ácido nucleico ou vetor. A construção ou vetor são preferivelmente adequados para a transformação em e/ou expressão dentro de uma célula de planta.

Um vetor é, *inter alia*, qualquer plasmídeo, cosmídeo, fago ou

vetor binário de *Agrobacterium* na forma de filamento duplo ou único linear ou circular, que pode ser auto transmissível ou mobilizável ou não, e que pode transformar hospedeiro procariótico ou eucariótico, em particular um hospedeiro de planta, pela integração no genoma celular ou existe
5 extracromossomicamente (por exemplo, plasmídeo de replicação autônoma com uma origem de replicação).

São especificamente incluídos vetores transportadores pelo qual é intencionado um veículo de DNA capaz, naturalmente ou por planejamento, de replicação em dois organismos diferentes, que podem ser
10 selecionados de *Actinomyces* e espécie, bactérias e células eucarióticas (por exemplo, de planta superior, de mamífero, levedura ou fúngica) relacionados.

Uma construção ou vetor que compreende ácido nucleico como descrito acima não precisam incluir um promotor ou outra sequência reguladora, particularmente se o vetor deve ser usado para introduzir o ácido
15 nucleico dentro de células para a recombinação no genoma.

As construções e vetores pode compreender ainda marcadores genéticos selecionáveis que consiste de genes que conferem fenótipos selecionáveis tais como resistência aos antibióticos tais como canamicina, higromicina, fosfinotricina, clorsulfuron, metotrexato, gentamicina,
20 espectinomicina, imidazolinonas, glifosato e d-aminoácidos.

Aqueles habilitados na técnica são bem capazes de construir vetores e planejar protocolos para a expressão de gene recombinante, em particular em uma célula de planta. Os vetores adequados podem ser escolhidos ou construídos, contendo sequências reguladoras apropriadas,
25 incluindo sequências promotoras, fragmentos de terminador, sequências de poliadenilação, sequências realçadoras, genes marcadores e outras sequências como apropriado. Para mais detalhes ver, por exemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual: 3ª edição, Sambrook & Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Aqueles habilitados na técnica podem construir vetores e planejar protocolos para a expressão de gene recombinante, por exemplo em uma célula microbiana ou de planta. Os vetores adequados podem ser escolhidos ou construídos, contendo sequências reguladoras apropriadas, incluindo sequências promotoras, fragmentos terminadores, sequências de poliadenilação, sequências realçadoras, genes marcadores e outras sequências como apropriado. Para mais detalhes ver, por exemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: 3ª edição, Sambrook *et al*, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press e *Protocols in Molecular Biology*, Segunda Edição, Ausubel *et al*. eds. John Wiley & Sons, 1992. Os procedimentos e vetores específicos anteriormente usados com amplo sucesso em plantas são descritos por Bevan, *Nucl. Acids Res.* (1984) 12, 8711-8721, e Guerineau e Mullineaux, (1993) *Plant transformation and expression vectors*. Em: *Plant Molecular Biology Labfax* (Croy RRD ed) Oxford, BIOS Scientific Publishers, pp 121-148.

Quando da introdução de uma construção de gene escolhida em uma célula, certas considerações devem ser levadas em conta, bem conhecidas por aqueles habilitados na técnica. O ácido nucleico a ser inserido deve ser montado dentro de uma construção que contenha elementos reguladores eficazes que direcionará a transcrição. Deve estar disponível um método de transportar a construção para dentro da célula. Uma vez que a construção esteja dentro da membrana celular, a integração no material cromossômico endógeno ocorrerá ou não.

Finalmente, o tipo de célula alvo é preferivelmente tal que as células possam ser regeneradas em plantas inteiras.

Aqueles habilitados na técnica também avaliarão que na produção de construções para se obter a expressão dos genes de acordo com esta invenção, é desejável usar um método de construção e transformação que realce a expressão do ácido nucleico que codifica a forma negativa dominante do polipeptídeo DA. A integração de uma cópia única do gene dentro do

genoma da célula de planta pode ser benéfica para minimizar os efeitos de silenciamento de gene. Do mesmo modo, o controle da complexidade da integração pode ser benéfico sob este aspecto. De interesse particular sob este aspecto é a transformação de células de planta que utilizam uma construção de expressão de gene mínima de acordo, por exemplo, com a Patente EP N^o EP1407000B1, aqui incorporada por referência para este propósito.

Técnicas bem conhecidas por aqueles habilitados na técnica podem ser usadas para introduzir construções de ácido nucleico e vetores em células de planta para produzir plantas transgênicas com as propriedades aqui descritas.

A transformação com *Agrobacterium* é um método amplamente usado por aqueles habilitados na técnica para transformar espécies de planta lenhosa, em particular espécies de madeira dura tal como choupo. A produção de plantas transgênicas estáveis, férteis é agora rotina na técnica (ver por exemplo Toriyama, *et al.* (1988) Bio/Technology 6, 1072-1074; Zhang, *et al.* (1988) Plant Cell Rep. 7, 379-384; Zhang, *et al.* (1988) Theor Appl Genet 76, 835-840; Shimamoto, *et al.* (1989) Nature 338, 274-276; Datta, *et al.* (1990) Bio/Technology 8, 736-740; Christou, *et al.* (1991) Bio/Technology 9, 957-962; Peng, *et al.* (1991) International Rice Research Institute, Manila, Filipinas 563-574; Cao, *et al.* (1992) Plant Cell Rep. 11, 585-591; Li, *et al.* (1993) Plant Cell Rep. 12, 250-255; Rathore, *et al.* (1993) Plant Molecular Biology 21, 871-884; Fromm, *et al.* (1990) Bio/Technology 8, 833-839; Gordon-Kamm, *et al.* (1990) Plant Cell 2, 603-618; D'Halluin, *et al.* (1992) Plant Cell 4, 1495-1505; Walters, *et al.* (1992) Plant Molecular Biology 18, 189-200; Koziel, *et al.* (1993) Biotechnology 11, 194200; Vasil, I. K. (1994) Plant Molecular Biology 25, 925-937; Weeks, *et al.* (1993) Plant Physiology 102, 1077-1084; Somers, *et al.* (1992) Bio/Technology 10, 1589-1594; WO92/14828; Nilsson, O. *et al.* (1992) Transgenic Research 1, 209-220).

Outros métodos, tais como bombardeamento de microprojétil ou partícula (US 5100792, EP-A-444882, EP-A-434616), eletroporação (EP 290395, WO 8706614), microinjeção (WO 92/09696, WO 94/00583, EP 331083, EP 175966, Green *et al.* (1987) Plant Tissue and Cell Culture, Academic Press), captação de DNA direta (DE 4005152, WO 9012096, US 4684611), captação de DNA mediada por lipossoma (por exemplo, Freeman *et al.* Plant Cell Physiol. 29: 1353 (1984)) ou o método de turbilhonamento (por exemplo, Kindle, PNAS U.S.A. 87: 1228 (1990d)) podem ser preferidos onde a transformação pela *Agrobacterium* é ineficiente ou ineficaz, por exemplo em algumas espécies de gimnosperma.

Os métodos físicos para a transformação de células de planta são revisados em Oard, 1991, Biotech. Adv. 9: 1-11.

Alternativamente, uma combinação de técnicas diferentes podem ser utilizadas para realçar a eficiência do processo de transformação, por exemplo, bombardeamento com micropartículas revestidas com *Agrobacterium* (EP-A-486234) ou bombardeamento de microprojétil para induzir ferimentos seguidos pelo co-cultivo com *Agrobacterium* (EP-A-486233).

A seguir da transformação, uma planta pode ser regenerada, por exemplo, a partir de células únicas, tecido de calo ou discos de folha, como é padrão na técnica. Quase qualquer planta pode ser totalmente regenerada a partir de células, tecidos e órgãos da planta. As técnicas disponíveis são revisadas em Vasil *et al.*, Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol I, II e III, Laboratory Procedures and Their Applications, Academic Press, 1984, e Weissbach e Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989.

A escolha particular de uma tecnologia de transformação será determinada pela sua eficiência para transformar certas espécies de planta assim como a experiência e preferência da pessoa que pratica a invenção com

uma metodologia particular de escolha. Estará evidente para a pessoa habilitada que a escolha particular de um sistema de transformação para introduzir ácido nucleico em células de planta não é essencial ou uma limitação da invenção, nem o é a escolha da técnica para a regeneração da planta.

Um outro aspecto da invenção fornece um método para alterar o fenótipo de uma planta que compreende:

expressar um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo DA negativo dominante dentro das células da dita planta em relação às plantas de controle.

Os polipeptídeos DA negativos dominantes adequados e métodos para a expressão em células de planta são descritos acima.

Uma planta com fenótipo alterado produzida como descrito acima pode ter um período prolongado de crescimento proliferativo e pode demonstrar um ou mais de longevidade aumentada, tamanho de órgão aumentado e tamanho de semente aumentado em relação às plantas de controle. Preferivelmente, a fertilidade de plantas tendo o fenótipo alterado é normal. Os métodos aqui descritos podem ser úteis, por exemplo, no aumento dos rendimentos da planta, melhora do rendimento de grão em plantas de safra, e/ou para aumentar a biomassa de planta, por exemplo, na produção de biocombustíveis.

O efeito de alelos negativos dominantes de proteínas DA é aqui mostrado ser realçado pela redução ou abolição da expressão ou função da proteína Big Brother (BB) na planta.

Big Brother (BB) é uma ubiquitina ligase E3 que é conhecida reprimir o crescimento de órgão de planta (Disch, 2006). Uma proteína BB pode compreender a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 9 (At3g63530 NP_001030922.1 GI: 79316205) ou a sequência de uma entrada de base de dados mostrada na tabela 9 ou pode ser um fragmento ou variante de qualquer

uma destas sequências que retém a atividade de BB ou é capaz de interferir com a função de BB.

Um polipeptídeo BB que é uma variante de uma sequência BB de referência, por exemplo a SEQ ID NO: 9 ou a sequência de uma entrada de base de dados mostrada na Tabela 9, pode compreender uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 20 %, pelo menos 30 %, pelo menos 40 %, pelo menos 50 %, pelo menos 60 %, pelo menos 70 %, pelo menos 80 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 % ou pelo menos 98 % de identidade de sequência com a sequência de referência. A identidade de sequência é descrita em mais detalhes acima.

As variantes de sequência de aminoácido particulares podem diferir do polipeptídeo BB da SEQ ID NO: 9 pela inserção, adição, substituição ou deleção de 1, 2, 3, 4, 5 a 10, 10 a 20, 20 a 30, 30 a 50 aminoácido ou mais do que 50 aminoácidos.

Em algumas formas de realização, um polipeptídeo BB pode compreender um A em uma posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID NO: 9.

Um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo BB pode por exemplo compreender um nucleotídeo apresentado em uma entrada de base de dados mostrada na tabela 10 ou pode ser uma variante ou fragmento desta.

Em algumas formas de realização preferidas, um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo BB pode compreender a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 10 (NM 001035845.1 GI: 79316204) ou pode ser uma variante ou fragmento desta sequência que codifica um polipeptídeo que retém a atividade de BB.

Uma sequência variante pode ser um mutante, homólogo ou alelo de uma sequência BB de referência, tal como a SEQ ID NO: 10 ou uma sequência tendo uma entrada de base de dados apresentada na tabela 10, e pode diferir da sequência BB de referência em uma ou mais de adição,

inserção, deleção ou substituição de um ou mais nucleotídeos no ácido nucleico, levando à adição, inserção, deleção ou substituição de um ou mais aminoácidos no polipeptídeo codificado. Naturalmente, as mudanças para o ácido nucleico que não fazem nenhuma diferença para a sequência de aminoácido codificada são incluídas. Um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo BB pode compreender uma sequência tendo pelo menos 20 % ou pelo menos 30 % de identidade de sequência com a sequência BB de referência de ácido nucleico, preferivelmente pelo menos 40 %, pelo menos 50 %, pelo menos 60 %, pelo menos 65 %, pelo menos 70 %, pelo menos 80 %, pelo menos 90 %, pelo menos 95 % ou pelo menos 98 %. A identidade de sequência é descrita acima.

Um fragmento ou variante pode compreender uma sequência que codifica um polipeptídeo BB funcional isto é, um polipeptídeo que retém uma ou mais características funcionais do polipeptídeo codificado pelo gene BB do tipo selvagem, por exemplo, atividade de ubiquitina ligase E3.

Um método para alterar um fenótipo de planta como aqui descrito pode compreender ainda reduzir ou abolir a expressão ou atividade de um polipeptídeo BB na dita planta.

Isto pode realçar ou aumentar o efeito da expressão de um polipeptídeo DA dominante negativo em um ou mais de tamanho de órgão, tamanho de semente ou longevidade.

Os métodos para reduzir ou abolir a expressão ou atividade de um polipeptídeo BB na dita planta são bem conhecidos na técnica e são descritos em mais detalhes abaixo.

A expressão da proteína ativa pode ser abolida pela mutação das sequências de ácido nucleico na célula de planta que codificam o polipeptídeo BB e regeneração de uma planta a partir da célula mutada. Os ácidos nucleicos podem ser mutados pela inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos. As técnicas para a inativação ou silenciamento de genes alvo

são bem conhecidas no ramo.

Por exemplo, um alelo E0D1 de um polipeptídeo BB pode ser gerado pela introdução de uma mutação, tal como uma deleção, inserção ou substituição, em uma posição que corresponde à posição 44 da SEQ ID NO: 9, por exemplo, uma substituição de A para T. Uma posição em uma sequência de polipeptídeo BB que é equivalente à posição 44 da SEQ ID NO: 9 pode ser identificada usando a análise de sequência padrão e ferramentas de alinhamento. Outras mutações adequadas para abolir a expressão de uma proteína ativa estará facilmente evidente para a pessoa habilitada.

10 A expressão de proteína ativa pode ser reduzida usando técnicas de supressão. A supressão da expressão de polipeptídeos alvos em células de planta é bem conhecida na técnica. Supressores de ácido nucleico adequados podem ser cópias de todos ou parte do gene BB alvo inserido na orientação de anti-sentido ou de sentido ou ambos em relação ao gene BB, 15 para obter a redução na expressão do gene BB. Ver, por exemplo, van der Krol *et al.*, (1990) *The Plant Cell* 2, 291-299; Napoli *et al.*, (1990) *The Plant Cell* 2, 279-289; Zhang *et al.*, (1992) *The Plant Cell* 4, 1575-1588, e US-A-5.231.020. Outros refinamentos deste método pode ser encontrado na WO95/34668 (Biosource); Angell & Baulcombe (1997) *The EMBO Journal* 20 16, 12: 3675-3684; e Voinnet & Baulcombe (1997) *Nature* 389: pg 553.

Em algumas formas de realização, os supressores de ácido nucleico podem ser supressores de sentido de expressão do polipeptídeo BB.

Um supressor de ácido nucleico de sentido adequado pode ser um RNA de filamento duplo (Fire A. *et al* *Nature*, Vol 391, (1998)). O 25 silenciamento mediado pelo dsRNA é específico de gene e é frequentemente chamado de interferência de RNA (RNAi). RNAi é um processo de duas etapas. Primeiro, o dsRNA é clivado dentro da célula para produzir RNAs interferentes curtos (siRNAs) de cerca de 21 a 23 nt de comprimento com fosfato no terminal 5' e projeções curtas em 3' (~2 nt). Os siRNAs alvejam a

sequência de mRNA correspondente especificamente para a destruição (Zamore P.D. Nature Structural Biology, 8, 9, 746-750, (2001)).

siRNAs (algumas vezes chamados de microRNAs) infra-regulam a expressão de gene pela ligação aos RNAs complementares e deflagram a eliminação de mRNA (RNAi) ou interrompem a tradução do mRNA em proteína. O siRNA pode ser derivado pelo processamento de RNAs de filamento duplo longos e quando encontrados na natureza são tipicamente de origem exógena. Os RNAs micro-interferentes (miRNA) são RNAs não codificadores pequenos endogenamente codificados, derivados pelo processamento de grampos de cabelo curtos. Tanto siRNA quanto miRNA podem inibir a tradução de mRNAs que carregam sequências alvo parcialmente complementares sem a clivagem do RNA e degradam mRNAs que carregam as sequências totalmente complementares.

Consequentemente, a presente invenção fornece o uso de sequências de RNAi com base na sequência de ácido nucleico BB para a supressão da expressão do polipeptídeo DA. Por exemplo, uma sequência de RNAi pode corresponder a um fragmento da SEQ ID NO: 10 ou outra sequência de ácido nucleico BB aludida acima ou uma variante desta.

As moléculas de siRNA são tipicamente de filamento duplo e, de modo a otimizar a eficácia da infra-regulagem mediada pelo RNA da função de um gene alvo, é preferido que o comprimento e a sequência da molécula de siRNA seja escolhida para garantir o reconhecimento correto do siRNA pelo complexo RISC que medeia o reconhecimento pelo siRNA do alvo de mRNA e de modo que o siRNA seja curto o bastante para reduzir uma resposta do hospedeiro.

Os ligandos de miRNA são tipicamente de filamento único e têm regiões que são parcialmente complementares permitindo que os ligandos formem um grampo de cabelo. miRNAs são sequências de RNA que são transcritas a partir do DNA, mas não são traduzidas em proteína. Uma

sequência de DNA que codifica um miRNA é mais longo do que o miRNA. Esta sequência de DNA inclui a sequência de miRNA e um complemento inverso aproximado. Quando esta sequência de DNA é transcrita em uma molécula de RNA de filamento único, a sequência de miRNA e seu par de
 5 base de complemento inverso para formar um segmento de RNA parcialmente de filamento duplo. O planejamento das sequências de microRNA é debatida em John *et al*, PLoS Biology, 11(2), 1862-1879, 2004.

Tipicamente, as moléculas de RNA intencionadas a imitar os efeitos de siRNA ou miRNA têm entre 10 e 40 ribonucleotídeos (ou seus
 10 análogos sintéticos), mais preferivelmente entre 17 e 30 ribonucleotídeos, mais preferivelmente entre 19 e 25 ribonucleotídeos e o mais preferivelmente entre 21 e 23 ribonucleotídeos. Em algumas formas de realização da invenção utilizando siRNA de filamento duplo, a molécula pode ter projeções 3' simétricas, por exemplo, de um ou dois (ribo)nucleotídeos, tipicamente uma
 15 projeção UU de dTdT 3'. Com base na divulgação aqui fornecida, a pessoa habilitada pode facilmente planejar sequências de siRNA e miRNA adequadas, por exemplo usando recursos tais como descobridor de siRNA da Ambion, ver

http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html. As
 20 sequências de siRNA e miRNA podem ser sinteticamente produzida e exogenamente adicionadas para causar a infra-regulagem do gene ou produzidas usando sistemas de expressão (por exemplo, vetores). Em uma forma de realização preferida, o siRNA é sinteticamente sintetizado.

Os RNAs de filamento duplo mais longo podem ser
 25 processados na célula para produzir siRNAs (ver por exemplo Myers (2003) Nature Biotechnology 21: 324-328). A molécula de dsRNA mais longa pode ter projeções 3' ou 5' simétricas, por exemplo, de um ou dois (ribo)nucleotídeos ou pode ter extremidades abruptas. As moléculas de dsRNA mais longas podem ter 25 nucleotídeos ou mais longa. Preferivelmente, as

moléculas dsRNA mais longas estão entre 25 e 30 nucleotídeos no comprimento. Mais preferivelmente, as moléculas de dsRNA mais longas estão entre 25 e 27 nucleotídeos de comprimento. O mais preferivelmente, as moléculas de dsRNA mais longas têm 27 nucleotídeos no comprimento.

5 dsRNAs de 30 nucleotídeos ou mais no comprimento podem ser expressados usando o vetor pDECAP (Shinagawa *et al.*, Genes e Dev., 17, 1340-5, 2003).

Uma outra alternativa é a expressão de uma molécula de RNA de grampo de cabelo curto (shRNA) na célula. shRNAs são mais estáveis do que siRNAs sintéticos. Um shRNA consiste de repetições invertidas curtas

10 separadas por uma sequência de alça pequena. Uma repetição invertida é complementar ao alvo de gene. Na célula o shRNA é processado pelo DICER em um siRNA que degrada o mRNA do gene alvo e suprime a expressão. Em uma forma de realização preferida o shRNA é produzido endogenamente (dentro de uma célula) pela transcrição de um vetor. shRNAs podem ser

15 produzidos dentro de uma célula pela transfecção da célula com um vetor que codifica a sequência de shRNA sob o controle de um promotor da RNA polimerase III tal como os promotores H1 ou 7SK humanos ou um promotor da RNA polimerase II. Alternativamente, o shRNA pode ser sintetizado exogenamente (*in vitro*) pela transcrição a partir de um vetor. O shRNA pode

20 ser depois introduzido diretamente na célula. Preferivelmente, a molécula de shRNA compreende uma sequência parcial de SHR. Por exemplo, a sequência de shRNA está entre 40 e 100 bases no comprimento, mais preferivelmente entre 40 e 70 bases no comprimento. A haste do grampo de cabelo tem preferivelmente entre 19 e 30 pares de base no comprimento. A haste pode

25 conter emparelhamentos G-U para estabilizar a estrutura do grampo de cabelo.

As moléculas de siRNA, moléculas de dsRNA mais longas ou moléculas de miRNA podem ser fabricadas recombinantemente pela transcrição de uma sequência de ácido nucleico, preferivelmente contida

dentro de um vetor. Preferivelmente, a molécula de siRNA, a molécula de dsRNA mais longa ou molécula de miRNA compreendem uma sequência parcial da SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 ou uma variante desta.

Em outras formas de realização, os supressores de ácido nucleico podem ser supressores de anti-sentido da expressão de dois ou mais polipeptídeos DA. No uso de sequências de anti-sentido para infra-regular a expressão de gene, uma sequência de nucleotídeo é colocada sob o controle de um promotor em uma “orientação inversa” tal que a transcrição produza RNA que é complementar ao mRNA normal transcrito a partir do filamento de “sentido” do gene alvo. Ver, por exemplo, Rothstein *et al*, 1987; Smith *et al.*, (1988) *Nature* 334, 724-726; Zhang *et al.*, (1992) *The Plant Cell* 4, 1575-1588, English *et al.*, (1996) *The Plant Cell* 8, 179-188. A tecnologia de anti-sentido também é revisada em Bourque, (1995), *Plant Science* 105, 125-149, e Flavell (1994) *PNAS USA* 91, 3490-3496.

Um supressor de ácido nucleico de anti-sentido pode compreender uma sequência de anti-sentido de pelo menos 10 nucleotídeos de uma sequência de nucleotídeo é um fragmento da SEQ ID NO: 10 ou outra sequência BB aludida acima ou uma variante desta.

Pode ser preferível que exista identidade de sequência completa na sequência usada para a infra-regulagem da expressão de uma sequência alvo, e a sequência alvo, embora a complementaridade ou similaridade totais de sequência não sejam essenciais. Um ou mais nucleotídeos podem diferir na sequência usada do gene alvo. Assim, uma sequência utilizada em uma infra-regulagem da expressão de gene de acordo com a presente invenção pode ser uma sequência do tipo selvagem (por exemplo, gene) selecionada daquelas disponíveis ou uma variante de uma tal sequência.

A sequência não precisa incluir uma matriz de leitura aberta ou especificar um RNA que seria traduzível. Pode ser preferido que haja

homologia suficiente para as respectivas moléculas de RNA de anti-sentido e de sentido a hibridizar. Pode haver infra regulagem da expressão de gene mesmo onde exista cerca de 5 %, 10 %, 15 % ou 20 % ou mais de desemparelhamentos entre a sequência usada e o gene alvo. Eficazmente, a

5 homologia deve ser suficiente para que a infra-regulagem da expressão de gene ocorra.

Os supressores de ácido nucleico podem ser operavelmente ligados aos promotores específicos de tecido ou indutíveis. Por exemplo, promotores específicos de tegumento e semente podem ser usados para infra-

10 regular especificamente dois ou mais ácidos nucleicos DA em óvulos e sementes em desenvolvimento para aumentar o tamanho de semente final.

O ácido nucleico que suprime a expressão de um polipeptídeo BB como aqui descrito pode ser operavelmente ligado a uma sequência reguladora heteróloga, tal como um promotor, por exemplo um promotor

15 constitutivo, indutível, específico de tecido ou específico de desenvolvimento como descrito acima.

A construção ou vetor pode ser transformado em células de planta e expressados como descrito acima.

Uma planta que expressa a forma negativa dominante do

20 polipeptídeo DA e, opcionalmente tendo a expressão reduzida ou abolida de um polipeptídeo BB, pode ser sexual ou assexualmente propagada ou a progênie ou descendentes podem ser cultivados.

Um outro aspecto da invenção fornece um método para produzir uma planta com um fenótipo alterado que compreende:

25 incorporar um ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo DA negativo dominante em uma célula de planta por meios de transformação, e;

regenerar a planta a partir de uma ou mais células transformadas.

O fenótipo alterado da planta produzida pelo método é descrito em mais detalhes acima. O método pode ser útil, por exemplo, na produção de plantas tendo rendimentos aumentados, por exemplo, plantas de safra tendo rendimento de grau aumentado, em relação às plantas de controle.

5 Em algumas formas de realização, um método pode compreender ainda reduzir ou abolir a expressão ou atividade de um polipeptídeo BB na célula de planta ou planta.

10 Isto pode ser realizado antes, ao mesmo tempo ou depois da incorporação do ácido nucleico que codifica o polipeptídeo DA negativo dominante. Por exemplo, em algumas formas de realização, a expressão ou atividade de um polipeptídeo BB pode ser abolida ou reduzida em uma ou mais células de planta que já incorporam o ácido nucleico que codifica o polipeptídeo DA negativo dominante. Em outras formas de realização, o ácido nucleico que codifica o polipeptídeo DA negativo dominante pode ser
15 incorporado em uma ou mais células de planta que têm a expressão abolida ou reduzida de um polipeptídeo BB.

20 Uma planta assim produzida pode compreender um ácido nucleico heterólogo que codifica um polipeptídeo DA negativo dominante e pode possuir expressão ou atividade abolida ou reduzida de um polipeptídeo BB em uma ou mais de suas células de planta.

25 A expressão ou atividade de um polipeptídeo BB pode ser reduzida ou abolida como descrito acima. Por exemplo, um método pode compreender incorporar um ácido nucleico heterólogo em uma célula de planta por meios de transformação, em que o ácido nucleico codifica um ácido nucleico supressor, tal como um siRNA ou shRNA, que reduz a expressão de um polipeptídeo BB.

Os ácidos nucleicos heterólogos que codificam o polipeptídeo DA negativo dominante e supressor de ácido nucleico BB podem estar no mesmo vetor de expressão ou diferentes e podem ser incorporados na célula

de planta pelas técnicas convencionais.

Os polipeptídeos DA negativos dominantes e supressores o ácido nucleico BB são descritos em mais detalhes acima.

Uma planta produzida como descrito acima pode ser sexual ou assexualmente propagada ou cultivada para produzir progênie ou descendentes. A progênie ou descendentes da planta regenerada a partir de uma ou mais células podem ser sexual ou assexualmente propagados ou cultivados. A planta ou a sua progênie ou descendentes podem ser cruzados com outras plantas ou com sigo mesmo.

Uma planta adequada para o uso nos presentes métodos é preferivelmente uma planta superior, por exemplo uma planta agrícola selecionada do grupo que consiste de *Lithospermum erythrorhizon*, *Taxus spp*, tabaco, curcúbitas, cenoura, brássica de planta, melões, pimenta de caiena, videiras, alface, morango, brássica de semente oleaginosa, beterraba açucareira, trigo, cevada, milho, arroz, soja, ervilhas, sorgo, girassol, tomate, batata, pimentão, crisântemo, cravo, linhaça, cânhamo e centeio.

Um outro aspecto da invenção fornece uma planta que expressa um polipeptídeo DA dominante negativo e opcionalmente tem reduzida ou abolida a expressão de um polipeptídeo BB, em que a dita planta demonstra um fenótipo alterado em relação ao controle.

O polipeptídeo DA negativo dominante pode ser polipeptídeo heterólogo.

Uma planta adequada pode ser produzida por um método aqui descrito.

Como descrito acima, a planta pode ter um ou mais de longevidade aumentada, tamanho de órgão aumentado, duração aumentada de crescimento proliferativo e tamanho de semente aumentado em relação às plantas de controle. A planta pode ter fertilidade normal em relação às plantas de controle.

Uma planta de acordo com a presente invenção pode ser uma que não produza sempre cria com as características dos pais em uma ou mais propriedades. As variedades de planta podem ser excluídas, particularmente variedades de planta registráveis de acordo com o Plant Breeders Rights.

5 Além de uma planta que expressa um polipeptídeo DA dominante negativo, por exemplo, uma planta produzida por um método aqui descrito, a invenção abrange qualquer clone de uma tal planta, semente, progênie e descendentes auto-polinizados ou híbridos, e qualquer parte ou propágulo de qualquer um destes, tais como cortes e semente, que possam ser
10 usados em reprodução ou propagação, sexual ou assexual. Também abrangida pela invenção está uma planta que é uma progênie, clone ou descendente sexual ou assexualmente propagados de uma tal planta ou qualquer parte ou propágulo da dita planta, progênie, clone ou descendente.

Os presentes inventores têm mostrado que reduzir ou abolir a
15 expressão ou atividade de dois ou mais polipeptídeos DA também produz um fenótipo alterado caracterizado pela fertilidade normal e um ou mais de longevidade aumentada, tamanho de órgão aumentado, duração aumentada de crescimento proliferativo e tamanho de semente aumentado.

Um outro aspecto da invenção fornece um método para alterar
20 o fenótipo de uma planta que compreende:

reduzir ou abolir a expressão ou atividade de duas ou mais proteína ativas DA em uma ou mais células da planta.

Um outro aspecto da invenção fornece um método para produzir uma planta com um fenótipo alterado que compreende:

25 reduzir ou abolir a expressão ou atividade de duas ou mais proteína ativas DA em uma célula de planta, e;

regenerar a planta a partir da célula de planta.

O fenótipo da planta a seguir da redução ou abolição da expressão é descrita em mais detalhes acima.

A expressão da proteína ativa pode ser abolida pela mutação de sequências de ácido nucleico na célula de planta que codifica as duas ou mais proteínas DA e regenerar uma planta a partir da célula mutada. Os ácidos nucleicos podem ser mutados pela inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos. As técnicas para a inativação ou silenciamento de genes alvos são bem conhecidos na técnica.

A expressão de polipeptídeos alvos em células de planta pode ser reduzida pelas técnicas de supressão. O uso de supressores de ácido nucleico para suprimir a expressão de polipeptídeos alvo em células de planta é bem conhecido na técnica e é descrita em mais detalhes acima.

Os supressores de ácido nucleico que reduzem a expressão de dois ou mais polipeptídeos DA podem ser operavelmente ligados a promotores específicos de tecido ou indutíveis. Por exemplo, promotores específicos de tegumento e semente podem ser usados para infra-regular especificamente dois ou mais ácidos nucleicos DA em óvulos e sementes em desenvolvimento para aumentar o tamanho de semente final.

Outros aspectos da invenção dizem respeito à super-expressão de polipeptídeos DA em células de planta. Um método para alterar o fenótipo de uma planta pode compreender:

expressar um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo DA dentro das células da dita planta.

A planta pode ter um fenótipo alterado caracterizado pela fertilidade normal e uma ou mais de longevidade reduzida, tamanho de órgão reduzido, duração reduzida de crescimento proliferativo e tamanho de semente reduzido em relação às plantas de controle.

O ácido nucleico que codifica um polipeptídeo DA pode ser expressado em uma célula de planta como descrita acima *mutatis mutandis* para os polipeptídeos DA dominantes negativos.

Um outro aspecto da invenção fornece um método para

identificar um polipeptídeo DA dominante negativo que compreende:

fornecer um ácido nucleico isolado que codifica um polipeptídeo DA,

incorporar uma ou mais mutações no ácido nucleico,

5 introduzir o ácido nucleico em uma célula de planta por meios de transformação;

regenerar a planta a partir de uma ou mais células transformadas e,

identificar o fenótipo da planta regenerada.

10 Um fenótipo alterado que inclui fertilidade normal e um ou mais de longevidade aumentada, tamanho de órgão aumentado e tamanho de semente aumentado em relação às plantas de controle é indicativo de que o ácido nucleico mutado codifica um alelo DA negativo dominante.

Um outro aspecto da invenção fornece um método para produzir um polipeptídeo DA negativo dominante que compreende:

fornecer uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo DA de planta,

identificar um resíduo R no polipeptídeo DA de planta codificado em uma posição equivalente à posição 358 da SEQ ID NO: 1 e

20 mutar o ácido nucleico para alterar o dito resíduo R no polipeptídeo DA de planta codificado,

a sequência de ácido nucleico mutante codificando um polipeptídeo DA dominante negativo.

25 O ácido nucleico mutado que codifica um polipeptídeo DA dominante negativo que é identificado ou produzido como descrito acima pode ser usado para produzir plantas tendo o fenótipo alterado, como descrito acima.

“e/ou” onde aqui usado deve ser interpretado como divulgação específica de cada uma das duas características ou componentes especificados

com ou sem o outro. Por exemplo “A e/ou B” deve ser interpretado como a divulgação específica de cada um de (i) A, (ii) B e (iii) A e B, exatamente como se cada um fosse aqui individualmente apresentado.

5 A menos que o contexto dite de outro modo, as descrições e definições das características apresentadas acima não são limitadas a nenhum aspecto ou forma de realização particulares da invenção e aplicam-se igualmente a todos os aspectos e formas de realização que são descritas.

10 Tendo sido no geral descrita a invenção acima, certos aspectos e formas de realização da invenção serão agora ilustrados por via de exemplo para prolongar a descrição escrita e capacidade legal da invenção, e para garantir a divulgação adequada do melhor modo de praticar a invenção. Aqueles habilitados na técnica avaliarão, entretanto, que o escopo desta invenção não deve ser interpretado como sendo limitado pelos detalhes destes exemplos. Ao invés, variações, extensões, modificações e equivalentes destas
15 extensões específicas e genéricas destes detalhes podem ser feitas sem divergir do escopo da invenção compreendido por esta divulgação. Portanto, para uma avaliação do escopo desta invenção e os direitos exclusivos aqui reivindicados, referência deve ser feita às reivindicações anexas a esta divulgação, incluindo seus equivalentes.

20 Todos os documentos mencionados neste relatório descritivo são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

Os conteúdos de todas as entradas de base de dados mencionados neste relatório descritivo também são aqui incorporados por referência em sua totalidade. Isto inclui as versões de quaisquer sequências
25 que são correntes na data de depósito deste pedido.

Exemplos

Os dados apresentados abaixo mostram que “DA1” é um regulador chave no término do crescimento de semente e órgão, e codifica uma nova proteína contendo domínios UIM e LIM. DA1 é mostrada controlar

tanto o tamanho da semente quanto o de órgão pela restrição da duração do crescimento proliferativo. *eod1*, um realçador de *dal-1*, é alélico para *bb*, sugerindo que o DA1 e a ubiquitina ligase E3 de BB, “Big Brother” {Disch, S. Curr Biol 16, 272-9 (2006); Science 289, 85-8 (2000)) podem atuar em

5 caminhos paralelos para controlar o tamanho final de sementes e órgãos de planta. É possível que DA1 e EOD1/BB possam compartilhar componentes a jusante que controlam o tamanho da semente e de órgão.

Estudo anterior tem mostrado que BB atua como um regulador negativo do crescimento de órgão, mais provavelmente pela marcação de

10 proteínas celulares para a degradação (Disch, S. Curr. Biol. 16, 272-279 (2006)). DA1 contém dois motivos UIM prognosticado, que pode ter a função de ligar ubiquitina e promover a ubiquitinação (Hurley, J. H. Biochem. J. 399, 361-372 (2006)).

A expressão do gene DA1 é induzida pelo fito-hormônio ácido

15 abscísico (ABA), e o mutante *dal-1* é insensível ao ABA, fornecendo indicação de que ABA regula negativamente o crescimento de órgão através de DA1. Os efeitos inibidores de ABA sobre o crescimento foram a muito tempo reconhecidos como resultando de uma inibição da divisão celular (Lui, J. H. Plant 194, 368-373 (1994), compatível com o fato de que ABA pode

20 induzir a expressão de um inibidor da cinase dependente de ciclina (ICK1), um regulador importante da progressão do ciclo celular (Wang, H. Cell Biol. Int. 27, 297-299 (2003)). No desenvolvimento de semente, a transição de sementes em desenvolvimento para sementes maduras também está correlacionado com um aumento no teor de ABA da semente (Finkelstein, R.

25 R. Plant Cell 14 Supl. S15-45 (2002)), o que sugere que ABA possa ser uma das marcas ambientais sentidas pelas plantas para controlar o tamanho final de sementes e órgãos, pela indução de reguladores do crescimento negativos tais como DA1. Nós aqui relatamos que um tal regulador de crescimento negativo é DA1.

Pela condução da análise genética dos mutantes duplos *abi4-1dal-1* e *abi5-1dal-1*, nós descobrimos que o fenótipo de tamanho de órgão grande de *dal-1* é independente dos caminhos ABI4 e ABI5.

Nós também mostramos aqui que supressores de *dal-1* (*sod1*) são moléculas que têm uma segunda mutação de sítio no gene mutante *dal-1* que são prognosticados reduzir a função de gene, indicando que a mutação R358K em DA1 é responsável pelo tamanho de semente aumentado e que o alelo *dal-1* interfere com as atividades de DARs.

Nós também mostramos aqui que o alelo R358K de *dal-1* também interfere com as funções de DA1 em uma maneira dependente da dosagem, como evidenciado pelo fato de que as plantas que super expressam o alelo *dal-1* (35S::DA1R358K) no tipo selvagem têm tamanho da semente e de órgão grande. Este resultado também demonstra que o gene mutante *dal-1* (DA1R358K) pode ser usado para engendrar geneticamente aumentos significantes no peso de semente e biomassa.

Até agora, alguns mutantes (por exemplo, *ap2* e *arf2*) que exibem sementes grandes usualmente têm efeitos negativos fortes na sua fertilidade e crescimento (Schruff, M. C. Development 137, 251-261 (2006); Ohto, M. A. Proc. Natl. Acad. Sci USA 102, 3123-3128 (2005); Jofuku, K. D. Proc. Natl Acad. Sci. USA 102, 3117-3122 (2005)). Entretanto, os experimentos apresentados abaixo mostram que *dal-1* tem massa de semente aumentada, tamanho de órgão grande, mas fertilidade normal, comparada com o tipo selvagem.

Métodos

Materiais de planta

O acesso da *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) foi usado como um tipo selvagem. Todos os mutantes estão no fundo Col-0, exceto quanto ao *dal-1Ler* e *bb-1*, que estão no fundo de *Landsberg erecta*. Antes da análise, *dal-1* e *dal-1Ler* foram retrocruzados em Col-0 e Ler seis vezes,

respectivamente. As linhagens de inserção de T-DNA foram obtidas da SIGnAL (Salk Institute) e NASC (Nottingham).

Triagem genética e clonagem com base em mapa

dal-1 foi identificado como um novo mutante de tamanho de
 5 semente e de órgão de uma das populações M2 tratadas com
 metanossulfonato de etila (EMS) do acesso Col-0. sod1-1, sod1-2, sod1-3 e
 eod1-1 foram identificados como supressores e realçadores de dal-1 a partir
 de uma das populações M2 tratadas com metanossulfonato de etila (EMS) de
 dal-1, respectivamente. As populações de mapeamento F2 foram geradas a
 10 partir de um único cruzamento de Ler/dal-1, Ler/sod1-3dal-1, e dal-
 1Ler/eod1-1dal-1. Uma lista de sequências iniciadoras é fornecida na Tabela
 2.

Plasmídeos e plantas transgênicas

As seguintes construções foram geradas: DA1COM,
 15 35S::DA1-HA, 35S::GFP-DA1, 35S::DA1-GFP, 35S::DA1R358K,
 pDA1::GUS, e 35S::EOD1.

Análise morfológica e celular

A preparação de amostra, medição, microscopia, e tingimento
 histoquímico para a atividade de S-glicuronidase usaram métodos padrão
 20 (Jefferson R., EMBO J. Embo J 6, 3901-3907 (1987)).

DA1 limita o tamanho de sementes e órgãos

Para identificar repressores do crescimento de semente e/ou
 órgão, nós triamos quanto a mutantes (DA significa 'grande' em Chinês) com
 tamanho de semente e/ou de órgão grande a partir de uma população
 25 mutagenizada EMS no acesso Col-0 de *Arabidopsis thaliana*. O mutante de
 dal-1 tem tamanho da semente e de órgão grande, mas fertilidade normal,
 comparada com o tipo selvagem (Figs. 1a-1p), fornecendo indicação de que o
 crescimento de semente e órgão compartilham mecanismos reguladores
 comuns. A análise genética com cruzamentos recíprocos entre dal-1 e plantas

do tipo selvagem revelou que *dal-1* possui uma mutação em um único local nuclear.

Para revelar diferenças no tamanho de semente entre tipo selvagem e mutante *dal-1*, nós examinamos o tamanho de semente do mutante *dal-1* pelo fracionamento das sementes produzidas pelas plantas do tipo selvagem e *dal-1* individuais pelo uso de uma série de peneiras de malha de arame. As sementes do tipo selvagem foram retidas apenas nas malhas de abertura de 180-300 μm enquanto as sementes mutantes demonstraram uma mudança na faixa para tamanhos de exclusão maiores, 180-355 μm (Figs. 5a e 5b). Mais do que 80 % das sementes do tipo selvagem foram retidas em malhas de abertura de 250 μm , ao passo que cerca de 70 % das sementes *dal-1* foram retidas em malhas de abertura de 300 μm . Para determinar se o aumento no tamanho de semente em *dal-1* refletiu uma alteração no tamanho do embrião, nós isolamos embriões maduros do tipo selvagem e sementes *dal-1* mutantes. embriões maduros *dal-1* foram significativamente mais gordos e mais longos do que aqueles do tipo selvagem (Fig. 1c e 1d). Nós observamos que a cavidade da semente em sementes *dal-1* é maior por todo o desenvolvimento do que aquela no tipo selvagem (Fig. 6). Além disso a massa de semente média de mutante *dal-1* é aumentada para 132 % daquela do tipo selvagem (Tabela 5).

A fertilidade da planta *dal-1* foi descoberta ser normal e o peso de semente médio por planta *dal-1* é mais alto do que para a planta do tipo selvagem (Fig. 5). Portanto, nós concluimos que *DA1* contribui para a determinação do tamanho de semente e peso de semente em *Arabidopsis*. Nós também identificamos exemplos de genes relacionados com *DA1* e *DAR* de plantas de safra que demonstram genes relacionados com funções relacionadas podem ser alvejados pela fabricação da mutação interferente dominante R358K ou reduzir a expressão de proteínas relacionadas com *DA1* e *DAR* selecionadas usando métodos de interferência de RNA descritos

acima.

Nós investigamos se DA1 atua maternal ou zigoticamente. Como mostrado na Tabela 1, o efeito da mutação *dal-1* sobre a massa de semente foi observado apenas quando plantas maternas foram homozigotas para a mutação. As sementes produzidas por uma mãe *dal-1*, independente do genótipo do doador de pólen, foram compativelmente mais pesadas do que aquelas produzidas pelas plantas maternas do tipo selvagem. Ao contrário, os pólenes mutante *dal-1* e tipo selvagem produziram sementes cujo peso foi comparável com aquele de plantas maternas do tipo selvagem. Estes resultados mostram que *dal-1* é uma mutação de efeito materno que afeta a massa de semente.

Além da massa de semente aumentada, o mutante *dal-1* exibiu tamanho de órgão maior do que o do tipo selvagem (Fig. 1e-m e o). Comparada com as do tipo selvagem, as plantas *dal-1* têm flores grandes (Fig. 1h e i) que frequentemente têm pétalas e carpelos extras (Fig. 7). O tamanho médio das pétalas de *dal-1* foi de cerca de 1,6 vezes aquele de pétalas do tipo selvagem comparáveis (Fig. 1o). As silíquas do mutante *dal-1* foram amplas, deformadas e achatadas, comparadas com a forma estreita, lisa, cilíndrica de silíquas do tipo selvagem (Fig. 1j e 1k). Os mutantes *dal-1* também forma cotilédones e folhas maiores, assim como hastes mais espessas do que as do tipo selvagem (Fig. 1e,-g , i, e m). Compatível com isto, os mutantes *dal-1* acumulam mais biomassa na forma de flores e folhas do que as plantas do tipo selvagem (Fig. 1p e q). Quando juntos, estes resultados indicam que DA1 limita o tamanho de sementes e órgãos em *Arabidopsis*.

DA1 restringe a duração do crescimento proliferativo

O tamanho de semente e órgão é determinado tanto pelo número de célula quanto pelo tamanho. Para entender qual parâmetro é responsável para o tamanho grande da semente e de órgão em mutante *dal-1*, nós analisamos o tamanho da célula de embriões, pétalas e folhas. Como

mostrado na Fig. 1r, o tamanho das células de embriões, pétalas e folhas da1-1, foram comparáveis com aquela de células do tipo selvagem correspondentes. O número de célula epidérmica da haste em mutante da1-1 é aumentado para 180 % daquele das hastes do tipo selvagem (Fig. 1n). Estes resultados indicam que os efeitos induzidos pela da1-1 sobre a massa de semente e tamanho de órgão são devido ao número de célula aumentado.

Para determinar como DA1 limita o tamanho da semente e de órgão, nós realizamos uma análise cinemática de embriões, pétalas, e folhas no tipo selvagem e no mutante da1-1. Nós manualmente polinizamos plantas mutantes da1-1 e do tipo selvagem com seus próprios grãos de pólen e examinaram a duração de desenvolvimento da semente. A maior parte das sementes do tipo selvagem se desenvolveram no estágio de dissecação em 8 dias depois da fertilização, ao passo que a maioria das sementes da1-1 se desenvolveram no estágio maduro em 10 dias depois da fertilização em nossas condições de cultivo, sugerindo que o período de desenvolvimento de semente do mutante da1-1 foi prolongado. A plotagem do tamanho de pétala primordial e folhas com o tempo revelou que a ampliação do órgão no mutante da1-1 é principalmente devido a um período de cultivo mais longo de tempo (Fig. 2a, c). Compatível com isto, as plantas da1-1 têm órgãos mais jovens e mais frescos em estágios de desenvolvimento mais precoces (Fig. 1g) e tempo de vida mais longo do que as do tipo selvagem (Fig. 12 e, f).

Para determinar como a divisão celular contribui para as dinâmicas de crescimento observadas, nós medimos o índice mitótico de pétalas e folhas no tipo selvagem e mutante. Um marcador de transgene da progressão do ciclo celular, uma fusão pCYCB1:1::GUS, foi usada para comparar o grau de proliferação celular nas pétalas em desenvolvimento de plantas do tipo selvagem e da1-1. As células nas pétalas da1-1 continuam a proliferar por um tempo mais longo do que aquelas nas pétalas do tipo selvagem (Fig. 2b). Similarmente, a parada do ciclo celular nas células de

folhas também foi demorada (Fig. 8). A análise do nível de ploidia também indicou que o mutante *dal-1* sai do ciclo celular mais tarde do que o tipo selvagem. Este resultado forneceu indicação de que *dal-1* exibe proliferação de célula prolongada.

5 DA1 codifica uma nova proteína contendo os domínios UIM e LIM

O local DA1 foi mapeado fino para uma região de cerca de 30 quilobases (kb) usando marcadores com base na reação da cadeia da polimerase (Fig. 9). O sequenciamento de DNA revelou que o alelo *dal-1* carrega uma única mutação de nucleotídeo de G para A no gene *Atlg19270* que co-segregou com o fenótipo *dal-1* e resulta em uma mudança de uma arginina (R) para uma lisina (K) no aminoácido 358 da proteína prognosticada (Fig. 3a e Fig. 9a,b). Um plasmídeo binário (DA1COM) que carrega um fragmento genômico do tipo selvagem de 6,4 kb contendo a ORF inteira e um plasmídeo (35S::DA1) que carrega o promotor 35S mais o cDNA *Atlg19270* foram capazes de recuperar os fenótipos do mutante *dal-1* (Fig. 1i-q e Fig. 2a), confirmando que o *Atlg19270* é de fato o gene DA1.

DA1 é prognosticado codificar uma proteína de 532 aminoácidos contendo dois motivos de interação de ubiquitina (UIM) (Hiyama, H. J. Bio. Chem. 274, 28019-28025 (1999)) e um domínio de ligação de zinco (LIM) presente em Lin-11, Isl-1, Mec-3 (Freyd, G. Nature 344, 876-879 (1990) no terminal N (ver as Sequências). O UIM é um motivo de peptídeo curto com a função dual de ligar ubiquitina e promover a ubiquitinação. Este motivo é conservado por todos os eucariotas e é presente em proteínas numerosas envolvidas em uma ampla variedade de processos celulares incluindo endocitose, tráfico de proteína, e transdução de sinal (Hurley J. H. Biochem. J. 399, 361-372 (2006)). O domínio LIM é um motivo de interação de proteína-proteína criticamente envolvido em uma variedade de processos biológicos fundamentais, incluindo organização de citoesqueleto, desenvolvimento de órgão e transdução de sinal (Dawid, I. B.

Trends Genet. 14, 156-162 (1998); Dawid, I. B. CR Acad. Sci. III 318, 295-306 (1995); Kadrmas, J. L. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5, 920-931 (2004)). Sete outras proteínas prognosticadas em *Arabidopsis* compartilham similaridade de aminoácido extensiva (> 30 % de identidade) com DA1 e foram nomeadas proteínas relacionadas com DA1 (DARs) (ver o alinhamento de sequência D). As regiões conservadas entre DA1 e DAR residem na porção de terminal C da molécula, indicando que estas regiões conservadas podem ser cruciais para a sua função. As proteínas que compartilham homologia significativa com DA1 fora do UIM e LIM também são encontradas em plantas e algas verdes, mas não em animais.

Os padrões de expressão espacial de DA1 foram revelados pelos ensaios histoquímicos da atividade de β -glicuronidase (GUS) de plantas transgênicas contendo as fusões de promotor DA1::GUS (pDA1::GUS). O tingimento histoquímico mostra a expressão de gene DA1 por toda a planta, incluindo cotilédones, folhas verdadeiras, flores, e embriões (Fig. 3b-h), compatível com os fenótipos de tamanho grande de plantas mutantes *dal-1*. Os níveis relativamente altos de atividade GUS foram detectadas em tecidos proliferativos (Fig. 3c-f). Além disso o promotor DA1 também é ativo em raízes (Fig. 3b, c). Dados os efeitos de hormônios sobre o crescimento de órgão, nós testamos se qualquer uma das classes principais de fito-hormônios (ácido abscísico, ácido jasmônico, etileno, auxina, citocinina, giberelina, brassinosteróides e glicose) influenciaria a transcrição do gene DA1. O nível de expressão do gene DA1 foi induzido lentamente por ABA (Fig. 3m), mas não por outros hormônios, sugerindo que o sinal ABA pode participar na regulação de DA1. Compatível com isso, o mutante *dal-1* é insensível a ABA (Fig. 3n), fornecendo indicação de que ABA pode ser um dos sinais ambientais que regulam o gene DA1 para limitar o crescimento de semente e órgão.

Uma fusão de tradução de proteína fluorescente verde (GFP)-

DA1 sob o controle do promotor 35S resgatou o fenótipo *dal-1*. Entretanto, nós não pudemos detecta o sinal GFP. Compatível com isto, nós também não pudemos detectar proteínas de DA1 de plantas transgênicas que super expressam DA1 com rótulos HA (35S::DA1-HA) e GFP (35S::DA1-GFP) usando western blot fornecendo indicação de que a proteína de DA1 é facilmente degradada ou clivada em plantas.

dal-1 atua como um tipo de mutação negativa dominante para as proteínas relacionadas com DA1

Para identificar os novos componentes do caminho DA1 que determina o tamanho final do tamanho da semente e de órgão, nós triamos quanto a supressores dos fenótipos de tamanho grande de semente e de órgão de *dal-1* (*sod*) e descobrimos três alelos *sod1* que foram mapeados para o local DA1 original. Nós sequenciamos o gene DA1 a partir destas linhagens e descobrimos que cada uma abrigou uma Segunda mutação de sítio que é prognosticada reduzir ou abolir a função de gene (Fig. 3A). Estas mutações de sítio secundárias no gene mutante *dal-1* suprimem o fenótipo *dal-1* indicam que a mutação (R358K) dentro da sequência codificadora de DA1 produz o tamanho grande da semente e de órgão. Compatível com isto, os rompimentos do gene DA1 via inserções de T-DNA (*dal-ko1*, *dal-ko2* e *dal-ko3*) não demonstram nenhum fenótipo óbvio (Fig. 10). Para determinar se uma mudança de aminoácido encontrada no alelo *dal-1* original foi necessário para o fenótipo *dal-1*, nós cruzamos *dal-1* com tipo selvagem ou linhagens *dal-ko*. Todas as linhagens heterozigóticas (F1) de cruzamentos entre Col-0 e *dal-1* exibiram o fenótipo do tipo selvagem, ao passo que todas as plantas F1 de cruzamentos entre *dal-1* e linhagens de T-DNA (*dal-ko1*, *dal-ko2* e *dal-ko3*) exibiram fenótipos similar ao *dal-1* (Fig. S9). além disso o fenótipo *dal-1* também foi observado em plantas do tipo selvagem que carregam o transgene 35S::DA1R358K (Fig. 1i-r). Portanto, a mutação R358K em DA1 é necessária e suficiente para causar o fenótipo *dal-1*.

Os alelos de perda de função não demonstram nenhum fenótipo óbvio. Nós portanto postulamos que DA1 pode atuar redundantemente com DARs e a expressão do alelo *dal-1* interfere com a capacidade de DARs para substituir DA1. Para testar esta hipótese, nós geramos mutantes duplos *dal-koldar1-1*. O mutante duplo *dal-koldar1-1* demonstrou o fenótipo *dal-1* original (Fig. 3i-1, Tabela 1 e Fig. 4e), indicando que *dal-1* atua como um tipo de alelo interferente recessivo para DARs. Os fenótipos tamanho de semente e de órgão grande de plantas que super expressam o alelo *dal-1* em Col-0 sugeriu que o alelo *dal-1* também interfere com a atividade de DA1 na maneira dependente da dosagem (Fig. 1i-q).

DA1 atua em paralelo com EOD1/BB, independente de ANT, AXR1, ARF2 e AP2

Em triagens de realçador, nós isolamos um alelo de um realçador recessivo de *dal-1* (*eod1-1*). As plantas *eod1-1dal-1* exibem tamanho de semente e de órgão maior, mais pétalas extras e período de vida mais longo do que o *dal-1* (Fig. 12a,b). Nós mapeamos a mutação *eod1-1* e descobrimos que a mesma foi ligada ao gene Big Brother (BB) (At3g63530) que codifica uma ubiquitina ligase E3 e reprime o crescimento de órgão na *Arabidopsis* {Disch, 2006}. O sequenciamento revelou que o alelo *eod1-1* carrega uma única mutação de nucleotídeo de G para A no At3g63530 e resultou em uma mudança de uma Alanina (A) para uma Treonina (T) no aminoácido 44 da proteína BB prognosticada (Fig. 12c). A inserção de T-DNA tanto no intron (*eod1-2*) quanto *bb-1* também realçou os fenótipos *dal-1* (Fig. 4 e Fig. 12d,e). Um plasmídeo binário (35S::EOD1) que carrega o promotor 35S mais o cDNA At3g63530 foi capaz de recuperar o fenótipo do mutante *eod1*, indicando que EOD1 é o gene BB. Para determinar as relações entre EOD1/BB e DA1 na limitação do tamanho de órgão, nós analisamos os níveis de expressão de mRNA de DA1 em um mutante *bb-1* e de BB em um

mutante *dal-1*. A expressão do gene *DA1* em um mutante *bb-1* e do gene *BB* em uma planta *dal-1* não é significativamente afetada, comparada com o tipo selvagem (Fig. 12a,b).

Para entender as relações genéticas entre *EOD1/BB* e *DA1*, nós medimos o tamanho da semente e pétala em mutantes duplos *eod1-2dal-1* e *bb-1dal-1Ler* e descobrimos que as mutações em *EOD1/BB* sinergisticamente realçam o fenótipo de *dal-1* (Fig. 4, Fig. 11 d, e e 12a), fornecendo indicação de que os dois genes atuam em caminhos paralelos para limitar o tamanho da semente e de órgão em plantas (Fig. 4e).

Alelos *aintegumenta* (*ant*) exibem pétalas pequenas e plantas que super expressam *ANT* exibem aumento de órgão por causa de um período prolongado de crescimento de órgão {Krizek, B. A. Dev Genet 25, 224-36 (1999); Mizukami, Y. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 942-7 (2000)}, fornecendo indicação de que *DA1* e *ANT* funcionaria antagonisticamente em um caminho comum. Para testar isto, nós analisamos os níveis de expressão de mRNA de *DA1* em mutantes *ant* e de *ANT* e seu alvo a jusante *CyclinD3;1* no mutante *dal-1*. Os níveis de mRNA *DA1* não mostram mudanças robustas em mutantes *ant* (Fig. 12b). Similarmente, os níveis de mRNA tanto de *ANT* quanto de *Cyclin3;1* não são significativamente afetados pela mutação *dal-1*, como é o nível de mRNA de *ARGOS* {Hu, Y. Plant Cell 15, 1951-61 (2003)} (Fig. 11c, d, e). A análise genética também mostrou que o fenótipo de tamanho de pétala do mutante *ant-5dal-1* foi essencialmente aditiva, fornecendo indicação de que *DA1* e *ANT* atuam em caminhos independentes. Nós também geramos os mutantes duplos *axr1-12dal-1*, *arf2-7dal-1* e *ap2-7dal-1*, visto que os mutantes *axr1*, *arf2* e *ap2* têm tamanho de órgão e/ou semente alterados (Lincoln, C. Plant Cell 2, 1071-1080 (1990); Schruff, M. C. Development 137, 251-261 (2006); Ohto, M. A. Proc. Natl Acad. Sci USA 102, 3123-3128 (2005); Jofuku, K. D. Proc. Natl Acad. Sci. USA 102, 3117-3122 (2005)). A análise genética revelou que o fenótipo de

tamanho da pétala do mutante *axr1-12dal-1* ou o fenótipo de tamanho de semente de *arf2-7dal-1* e *ap2-7dal-1* foram essencialmente aditivos (Fig. 12b,c,d,e), comparados com a suas linhagens precursoras. Portanto, nós concluímos que DA1 parece atuar em paralelo com EOD1/BB, independente de ANT, ARX1, ARF2 e AP2.

A família da proteína de DA1 em *Arabidopsis thaliana*

Como descrito acima, o gene DA1 é prognosticado codificar uma proteína de 532 aminoácidos contendo dois motivos de interação de ubiquitina (UIM) típicos dos receptores de ubiquitina e um único domínio de ligação de zinco LIM definido pela sua conservação com os domínios Lin-11, Isl-1, e Mec-3 canônicos (Li *et al.* 2008). Em *Arabidopsis*, sete outras proteínas prognosticadas compartilham similaridade de aminoácido no terminal C extensiva (fora dos domínios UIM e LIM) com DA1 e foram chamados de proteínas relacionadas com DA1 (DAR), das quais quatro (DAR3, DAR5-7) são encontradas em um grupo em tandem no cromossoma 5. Usando SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/smart/showmotifs.p1>), os domínios funcionais diferentes foram caracterizados (ver a Tabela 11).

UIM é o motivo que interage com a ubiquitina com dois resíduos de serina conservados requeridos para a ligação e forma uma estrutura de hélice α curta com ubiquitina (Haglund e Dikic 2005). LIM é um motivo de interação de proteína rica em cisteína, tem capacidade de ligação de zinco (Freyd *et al.* 1990). NB-ARC (significa “um adaptador de ligação de nucleotídeo compartilhado pelo APAF-1, certos produtos de gene R e CED-4”) liga um módulo de interação de proteína-proteína a um domínio efetor, este é um novo motivo de sinalização compartilhado pelos produtos de gene de resistência da planta e reguladores da morte da célula em animais. LRRs são repetições ricas em leucina, são motivos de sequência curta e são considerados estar envolvidos nas interações de proteína-proteína. RPW8 pertence a uma família que consiste de diversas proteínas de resistência a

mofo de amplo espectro de *Arabidopsis thaliana*.

Estas estruturas de proteína diversas fornecem indicação de que a família tem diversas funções e tem recentemente diversificado funcionalmente. A Tabela 11 pode ser usada para guiar a formação de
 5 mutantes duplos e triplos por exemplo, DA1, DAR1 são similares e foram mostrados funcionar redundantemente; é possível que DA6 e DAR7 também possam funcionar redundantemente entre si e DA1 e DAR1 por causa das suas estruturas similares.

Caracterização de proteínas equivalentes a DA1 (DAL) em
 10 *Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffi*, *Brassica rapa*, *Brachypodium distachyon* e *Oryza sativa*

As sequências de aminoácido de *Arabidopsis* DA1 e DAR1-7 foram usadas como questões para triar as bases de dados de *Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffi*, *Brassica rapa*, *Brachypodium distachyon* e
 15 *Oryza sativa*. Usando algoritmos BLAST diferentes, genes candidatos foram depois selecionados para a análise filogenética preliminar.

Proteínas equivalentes a DA1 em plantas de solo precoces, *Physcomitrella patens* e *Selaginella moellendorffi*

Os ortólogos da família DA1 em *P. patens* foram pesquisados
 20 usando-se sequência de aminoácido DA1 como questão em NCBI BLAST, e depois revisado em JGI *P. patens* BLAST (http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/runAlignment?db=Phypal_1&advanced=1). Oito genes (PpDAL1-8) foram selecionados com base nas contagens, os valores E e análise filogenética preliminar. Todas as proteínas equivalentes a DA1 de *P. patens*
 25 são mais curtas do que as sequências de aminoácido de DA1, devido à ausência dos dois domínios UIM no terminal N (ver a Figura 1), de acordo com o programa SMART (Simple Molecular Architecture Research Tool) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). O projeto de sequenciamento de *S. moellendorffi* nos fornece uma oportunidade para investigar a ortologia da

família DA1 em planta vascular primária. Usando-se JGI *S. moellendorffi* BLAST(<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/runAlignment?db=Selmol&advanced=1>), dois ortólogos foram encontrados, e comparando com as proteínas equivalentes a DA1 de *P. patens*, eles tiveram comprimento de sequências de aminoácido similares com as proteínas da família DA1 da *Arabidopsis*. As regiões que precedem o domínio LIM foram prognosticadas ser regiões de baixa complexidade pelo SMART, e nenhum motivo de sequência de proteína UIM evidente foi encontrado. Nós podemos concluir portanto que a estrutura da proteína de DA1 característica não é encontrada em plantas inferiores.

10 Proteínas equivalentes a DA1 em Brassica rapa

Devido às relações evolucionárias de *Arabidopsis* e *Brassica*, os métodos BLAST de nucleotídeo para identificar ortólogos da família DA1 de *Brassica* ortólogos foram usados. Na base de dados de *Brassica* (<http://www.brassica.bbsrc.ac.uk/>), as sequências de cDNA de tamanho natural de *Arabidopsis* DA1 e DAR1-7 foram usadas como questões. Por causa de uma duplicação de genoma inteiro recente, um gene de *Arabidopsis* provavelmente tem 2 ou 3 genes homólogos em *Brassica rapa*. Dois ortólogos de DA1 e um ortólogo de DAR2 foram encontrados (Figura 1). Estes foram chamados genes DAL (Equivalentes a DA). Os ortólogos DAR3-7 de *Brassica* também foram encontrados em um grupo em tandem. O número de ortólogos de *Brassica* encontrado é menor do que o prognosticado provavelmente devido ao sequenciamento de genoma incompleto. As sequências parciais dos genes DAL de Brassica foram usados para planejar iniciadores para a amplificação específica de genes DAL de tamanho natural de *B. rapa*.

25 As proteínas equivalentes a DA1 nas gramíneas *Brachypodium distachyon* e *Oryza sativa*

Em *Brachypodium distachyon*, três ortólogos da família DA1 principais foram identificados, e em *Oryza sativa*, quatro proteínas equivalentes a DA1 foram encontradas usando PROTEIN BLAST no NCBI.

Os ortólogos DA1 e DAR2 do arroz foram identificados e nomeados OsDA1 e OsDAR2. No gene do arroz foi descoberto emparelhar DAR1 de *Arabidopsis*.

Na árvore filogenética da Figura 14 todas as proteínas equivalentes a DA a partir de plantas vasculares formam um Clado grande. Neste clado, as proteínas equivalentes a DA de *S. moellendorffi* são altamente divergentes, mas é possível que as proteínas equivalentes a DA originem-se de briófitos, e funcionem como reguladores de tamanho desde a evolução das primeiras plantas vasculares (*Lycophytes*). Na árvore, um Clado foi formado por AtDAR2, BrDAR2, BdDAL3 e OsDAR2. Estas sequências de proteína mostram similaridade maior, sugerindo que DAR2 evoluiu antes que as monocotiledôneas se originassem (ver o gráfico à direita da Figura 14) e é funcionalmente conservada durante a evolução. Um outro Clado consiste de AtDA1, BrDA1a e BrDA1b. A alta similaridade entre elas sugere que as proteínas de DA1 de *Brassica rapa* tivessem a mesma função como AtDA1. O Clado que consiste de OsDA1, BdDAL1 e BdDAL2 foi colocado separadamente deste Clado (ver a Figura 14), indicando que as proteínas de DA1 de grama podem ser de modo funcional levemente divergente daquelas nas *Brassicaceae*. Todas as DAR1 e DAR3-7 de *Brassicaceae* foram colocadas em um Clado, indicando que estes genes provavelmente surgiram de DA1 ou DAR2 na duplicação do genoma dentro das *Brassicaceae*. Esta hipótese foi parcialmente provada pela análise genética, que demonstrou, em *Arabidopsis*, que DA1 e DAR1 são redundantes funcionais.

A análise funcional das proteínas equivalentes de DA1 em *Brassica rapa*, *Oryza sativa*

Em ambiente virtual, dois genes equivalentes a DA1 de *Brassica rapa* (BrDA1a, BrDA1b) e um gene equivalentes a DA1 do arroz (OsDA1) foram identificados. cDNAs de tamanho natural foram sintetizados e sequenciados usando vetores TOPO direcionais. As características

bioquímicas prognosticadas de AtDA1, BrDA1a, BrDA1b e OsDA1 são mostradas na Tabela 12. As proteínas que estes três genes codificam têm características bioquímicas muito similares, particularmente os dois de *Brassica*. De maneira interessante, embora a análise com base nas sequências de aminoácido mostrassem que BrDA1a está mais próximo de AtDA1, BrDA1b foi prognosticado ter mais características bioquímicas similares a AtDA1 (Tabela 12).

Os fenótipos de dal-1 são recuperados pelos genes BrDA1a, BrDA1b e OsDA1

Os cDNAs de BrDA1a, BrDA1b e OsDA1 de tamanho natural foram sub-clonados em vetores TOPO e transferidos para vetores de destinação binária pMDC32 pela recombinação LR. Estes vetores expressam cDNAs a partir do promotor 35S constitutivo. As plantas dal-1 foram transformadas para testar se os genes DAL tipo selvagem de *Brassica* e arroz complementarizam os fenótipos de crescimento grande de plantas dal-1. As plantas transgênicas 35S::BrDA1a e 35S::OsDA1 mostraram complementação pelo menos parcial (ver a Figura 15A-D). De maneira interessante, embora BrDA1b não seja o homólogo mais próximo a AtDA1, as plantas transgênicas 35S::BrDA1b mostraram complementação completa do fenótipo dal-1 (ver as Figuras 15E-G), compatível com a alta similaridade bioquímica com AtDA1 (ver a Tabela 12). Duas rodadas de transformantes foram triadas. Na primeira rodada, 10 das 40 plantas T1 de 35S::BrDA1a e 3 das 11 plantas T1 de 35S::OsDA1 mostram fenótipos de siliquas na Figura 15A-D. Na segunda rodada, 30 das 150 35S::BrDA1b mostraram os fenótipos de folhas de roseta na Figura 15E-G. Estes são dados convincentes de que BrDA1b funciona como DA1 de *Arabidopsis*. Consequentemente nós demonstramos que DA1 e genes relacionados têm funções similares no controle do tamanho de órgão e semente em *Brassica* e arroz, e provavelmente em muitos outros tipos de plantas.

BrDA1a^{R358K} pode interferir com a função de AtDA1 em plantas Col-0

A mutagênese loco dirigida foi usada para gerar a mutação equivalente a R358K no cDNA de BrDA1a no vetor TOPO e depois o cDNA mutado foi transferido para vetores de destinação pMDC32 usando o sistema gateway. Os fenótipos da1-1 típicos foram observados em plantas Col-0 tipo selvagem que expressam 35S::BrDA1a^{R358K} (ver as Figuras 15E,F,H), incluindo fenótipos de órgão grande. Neste experimento de transformação, 60 plantas transgênicas T1 foram triadas e 7 destas foram descobertas ter fenótipos de órgão grande característicos observados em plantas da1-1.

10 Estabilidade da proteína de DA1.

Nós observamos que os transformantes que expressam as fusões da proteína GFP com o terminal C da proteína de DA1 de tamanho natural complementa o fenótipo de órgão grande DA1^{R358K}, demonstrando que a proteína de fusão é totalmente funcional. Entretanto, nós não detectamos fluorescência de GFP em muitas linhagens transgênicas, para fornecer indicação de que os níveis de proteína de DA1GFP são muito baixos. Isto é sustentado pela observação de que a detecção da proteína de DA1 com um bom anticorpo específico em extratos de planta é muito difícil. Nós portanto testamos a estabilidade da proteína de DA1 em *Arabidopsis* usando a proteína de DA1 expressada na *E. coli* e extratos de proteína isentas de célula de *Arabidopsis*. A proteína de DA1 de tamanho natural expressada e purificada como uma proteína de fusão de GST de terminal N, foi incubada com extratos de proteína de *Arabidopsis* e ATP, e submetida à análise de Western usando um anticorpo DA1 específico. A proteína de DA1 foi descoberta ser rapidamente degradada sob estas condições. MG132, um inibidor específico do proteassoma, foi descoberto abolir esta degradação. Portanto, DA1 é rapidamente degradado pelo proteassoma em *Arabidopsis*. Os motivos UIM de DA1 são prognosticados, com base no conhecimento da função UIM em células de animal, como estando envolvida na ubiquitinação. Pode ser que

DA1 seja ubiquitinado e alvejado para a degradação como parte do mecanismo de controle do crescimento.

Precursor		F1
Feminino	Masculino	Peso de Semente
Col-0	Col-0	2,368 ± 0,023
Col-0	da1-1	2,427 ± 0,031
da1-1	Col-0	3,189 ± 0,042
da1-1	da1-1	3,231 ± 0,046

O peso de semente médio é dado em mg por 100 sementes. Os valores de desvio padrão foram dados (n = 5). As plantas foram cultivadas juntas nas mesmas condições.

Tabela 1 DA1 atua maternalmente para controlar o peso de semente

Marcador	Iniciador direto	Iniciador inverso	Enzima (on de restrição
T16N11	TAATTTAATATTTCTTCTTCCCC	TTACTTTGACTCACTTTTCACCAC	
F6A14	AATTAGAATAATAATGCAGCGTTG	CGTTTCGGTATCGCTTTGCG	
F14D16-12	TTG GTT TTC GTT GGG TCA AGG	TGTTTCTGCAGAAGCGAGGG	
T29M8-26	AATCACGTGGTGTCTTAGCC	ACTCATTTTGGCAGCTTGGTG	
DA1CAPS	GACACCATGCAATGCCAACC	CTTTGAGCCTCATCCACGCA	Mnl I
F18014-78	CTCAGGCTCAGGTAAATGCG	TTACAGTCCGAAACGCATCC	BsaHI
F18014-52	CTAACACGACCCACATGATGC	CTCGAGTTTCGTGGTTACGG	NspI
T20H2	AGCATCCTCAAGGTATAAGCC	GGTGCTGCATTTCTGTCAAC	
CER451450	GGTTGCTCTAAATCACCTAACG	CTCACCAGAATATGCATATGTG	

As enzimas de restrição para os marcadores CAPS ou dCAPS são indicadas e as outras são marcadores SSLP

Tabela 2 Lista de marcadores moleculares com base na PCR.

Nome do gene	Iniciador direto	Iniciador inverso
RT-DA1	ATGGGTTGGTTTAACAAGATCTTT	AACCGGAATCTACCGGTCA
RT-DAR1	ATGGAGTTTCTTCTCTTTCTTGG	TTAAATCCATTTAGGAAATGTACCG
RT-ACTIN	GAGAAGATGACTCAGATC	ATCCTTCCTGATATCGAC
QRT-DA1	GACACCATGCAATGCCAACC	CTTTGAGCCTCATCCACGCA
QRT-TUB6	GGTGAAGGAATGGACGAGAT	GTCATCTGCAGTTGCGTCTT

Tabela 3 Lista de Iniciadores para a RT-PCR e QRT-PCR

Linhagens de T-DNA	LP	RP
SALK_126092	AAGCCAGCTAAATATGATTGG	AATCCGTTTGGAACTCGTTTG
SALK_110232	GAATTTGGTTTCGGTTGGTTTG	TCACATGCCAGAAACAAGAGG
SALK_054295	TCCTCTTGGTTGAGAGACAAGC	TCCATTTGGGTTCTTAAACCG
SALK_067100	ATTTAGTCGAAGCCATGCATG	TTACAAGGAGCAGCATCATCC
SALK_016122	TGAGGTGGCCTATTTTGATACC	CACAACCTTAGTCACTTCAGAAGG
SALK_045169	GAGCGATGCATCTCTAACCAC	AGTAGGAACAGAAAGCAGGGG
Lba	TGGTTCACTAGTGGGCCATCG	

Tabela 4 Lista de Iniciadores para verificar T-DNA.

Genótipo	Peso de semente médio mg	% de aumento em relação ao tipo selvagem
Col-0	2,206 ± 0,015	
da1-1	2,915 ± 0,039	+32
DA1COM # 2	2,182 ± 0,022	
DA1COM # 3	2,301 ± 0,018	
35S::DA1 ^{R358K} # 2	2,513 ± 0,026	+14
35S::DA1 ^{R358K} # 5	2,672 ± 0,019	+21
da1-ko1	2,231 ± 0,029	
dar1-1	2,199 ± 0,032	
da1-ko1 dar1-1	2,727 ± 0,019	+24

As plantas foram cultivadas sob condições idênticas.

O peso de semente médio é dado em mg por 100 sementes. Os valores de desvio padrão foram dados (n = 5). Os aumentos percentuais no peso de semente foram calculados com base na comparação com aqueles das sementes do tipo selvagem produzidas sob condições de cultivo similares.

Tabela 5 DA1 controla o peso de semente

1: CA061229

5

produto de proteína não denominada [Vitis vinifera]

gi|157335399|emb|CA061229.1| [157335399]

2: EAZ36049

proteína hipotética OsJ_019532 [Oryza sativa (grupo do cultivar japônica)]

10

gi|125596269|gb|EAZ36049.1| [125596269]

3: EAY99923

proteína hipotética OsI_021156 [Oryza sativa (grupo do cultivar indica)]

gi|125554318|gb|EAY99923.1| [125554318]

4: NP 001056985

5 Os06g0182500 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]

gi|115466772|ref|NP_001056985.1| [115466772]

5: CA022922

produto de proteína não denominada [Vitis vinifera]

gi|157348212|bem|CA022922.1| [157348212]

10 6: EAZ21100

proteína hipotética OsJ_035309 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]

gi|125579954|gb|EAZ21100.1| [125579954]

7: NP 001067188

15 Os12g0596800 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]

gi|115489402|ref|NP_001067188.1| [115489402]

8: CA022921

produto de proteína não denominada [Vitis vinifera]

gi|157348211|bem|CA022921.1| [157348211]

20 9: AAW34243

proteína contendo domínio LIM putativa [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]

gi|57164484|gb|AAW34243.1| [57164484]

10: AAW34242

25 proteína contendo domínio LIM putativa [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]

gi|57164483|gb|AAW34242.1| [57164483]

11: NP 001050702

Os03g0626600 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]

gi|115454203|ref|NP_001050702.1|[115454203]

12: EAY83760

proteína hipotética Os1_037719 [Oryza sativa (grupo do cultivar indica)]

gi|125537272|gb|EAY83760.1|[125537272]

13: EAZ27845

proteína hipotética OsJ_011328 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]

gi|125587181|gb|EAZ27845.1|[125587181]

14: NP_001049668

Os03g0267800 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]

gi|115452135|ref|NP_001049668.1|[115452135]

15: EAY91080

proteína hipotética OsI_012313 [Oryza sativa (grupo do cultivar indica)]

gi|125544941|gb|EAY91080.1|[125544941]

16: AAP06895

proteína hipotética [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]

gi|29893641|gb|AAP06895.1|[29893641]

17: EAY89390

proteína hipotética Os1_010623 [Oryza sativa (grupo do cultivar indica)]

gi|125543251|gb|EAY89390.1|[125543251]

18: CA016347

produto de proteína não denominada [Vitis vinifera]

gi|157346464|emb|CA016347.1|[157346464]

19: CAN64300

proteína hipotética [Vitis vinifera]

gi|147817187|emb|CAN64300.1|[147817187]

20: CAN69394

proteína hipotética [Vitis vinifera]

gi|147768077|emb|CAN69394.1|[147768077]

Tabela 6

5	Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) Os06g0182500 (Os06g0182500) mRNA, cds completo gi 115466771 ref NM_001063520.1 [115466771] Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) clone de cDNA: 001- 201-F10, sequência de inserto completa
10	gi 32990928 dbj AK105719.1 [32990928] Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) clone de cDNA: J023004G21, sequência de inserto completa gi 32979080 dbj AK069056.1 [32979080] Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) Os12g0596800 15 (Os12g0596800) mRNA, cds completa gi 115489401 ref NM_001073720.1 [115489401] Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) clone de cDNA: J013039D10, sequência de inserto completa gi 32975778 dbf AK065760.1 [32975778]
20	Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) clone de cDNA: J013073011, sequência de inserto completa gi 32976683 dbj AK066665.1 [32976683] Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) Os03g0626600 (Os03g0626600) mRNA, cds parcial
25	gi 115454202 ref NM_001057237.1 [115454202] Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) clone de cDNA: 001- 043-H07, sequência de inserto completa gi 32972053 dbf AK062035.1 [32972053] Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) Os03g0267800

(Os03g0267800) mRNA, cds completa

gi|115452134|ref|NM_001056203.1|[115452134]

Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) clone de cDNA:
J023020C05, sequência de inserto completa

5 gi|32979610|dbf|AK069586.1|[32979610]

Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) mRNA desconhecido
29050 isolado

gi|29368349|gb|AY224559.1|[29368349]

10 Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) mRNA da proteína
equivalente à resistência à doença 29050 isolado, cds parcial

gi|29367476|gb|AY224475.1|[29367476]

Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) DNA genômico,
cromossoma 6

gi|58531193|dbf|AP008212.1|[58531193]

15 Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) DNA genômico,
cromossoma 6, clone BAC: OSJNBb0036B04

gi|50657316|dbj|AP007226.1|[50657316]

Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) DNA genômico,
cromossoma 12

20 gi|58531199|dbj|AP008218.1|[58531199]

Oryza sativa cromossoma 12, BAC OSJNBa0056D07 da
biblioteca OSJNBa do cromossoma 12 do cultivar Nipponbare da ssp.
japonica de Oryza sativa (arroz), sequência completa

gi|23897123|bem|AL928754.2|[23897123]

25 Oryza sativa cromossoma 12, BAC 0J1306_H03 da biblioteca
Monsanto do cromossoma 12 do cultivar Nipponbare da ssp. japonica de
Oryza sativa (arroz), sequência completa

gi|20513132|emb|AL713904.3|[20513132]

Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) DNA genômico,

cromossoma 3 gi|58530789|dbf|AP008209.1|[58530789]

Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) cromossoma 3 clone
OSJNBa0002I03 mapa E1419S, sequência completa

gi|57164481|gb|AC091246.8|[57164481]

5 Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) cromossoma 3 clone
OJA1364E02, sequência completa

gi|27901829|gb|AC139168.1|[27901829]

Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) cromossoma 3 clone
OJ1364E02, sequência completa

10 gi|27901828|gb|AC135208.3|[27901828]

Oryza sativa cromossoma 3 BAC OSJNBb0013K08 sequência
genômica, sequência completa

gi|16356889|gb|AC092390.3|[16356889]

15 Oryza sativa (grupo do cultivar indica) clone OSE-97-192-H5
mRNA da proteína de ligação do íon zn, cds parcial

gi|149390776|gb|EF575818.1|[149390776]

Oryza sativa (grupo do cultivar indica) clone de cDNA:
OSIGCRA102J03, sequência de inserto completa

gi|116633496|emb|CT833300.1|[116633496]

20 Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) OsOlg0916000
(Os01g0916000) mRNA, cds completa

gi|115441820|ref|NM_001051725.1|[115441820]

Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) DNA genômico,
cromossoma 1 gi|58530787|dbj|AP008207.1|[58530787]

25 Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) DNA genômico,
cromossoma 1, clone PAC: PO413C03

gi|19386744|dbf|AP003451.4|[19386744]

Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) DNA genômico,
cromossoma 1, clone PAC: P0004D12

gi|20804980|dbj|AP003433.3|[20804980]

Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) clone de cDNA: 002-101-004, sequência de inserto completa

gi|32991509|dbj|AK106300.1|[32991509]

5 Oryza sativa (grupo do cultivar japonica) cDNA, clone: J100024013, sequência de inserto completa

gi|16012466|dbj|AK243101.1|[116012466]

Zea mays clone ELO1N0524A08.d mRNA sequência
gi|54653541|gb|BT018760.1|[54653541]

10 Zea mays PC0156068 sequência de mRNA

gi|21212590|gb|AY109151.1|[21212590]

Zea mays clone EL01N0553E07 sequência de mRNA

gi|85540336|gb|BT024085.1|[85540336]

Zea mays clone E04912705F06.c sequência de mRNA

15 gi|54651736|gb|BT016955.1|[54651736]

Zea mays gene da nitrato redutase, região promotora

gi|4894987|gb|AF141939.1|AF141939|[4894987]

Hordeum vulgare subsp. vulgare clone de cDNA: FLbaf82h16, sequência de mRNA

20 gi|151419042|dbf|AK250393.1|[151419042)

Vitis vinifera, sequência de shotgun de genoma inteiro, contig VV78X106678.4, clone ENTAV 115

gi|123680846|emb|AM488121.1|[123680846]

Vitis vinifera contig VV78X222701,5, sequência de shotgun
25 de genoma inteiro

gi|147817185|emb|AM484789.2|[147817185]

Vitis vinifera, sequência de shotgun de genoma inteiro, contig VV78X165152.5, clone ENTAV 115

gi|123703056|emb|AM483648.1|[123703056]

Vitis vinifera contig VV78X263569.4, sequência de shotgun
de genoma inteiro

gi|147790377|emb|AM453516.2|[147790377]

Vitis vinifera contig VV78X179395.3, sequência de shotgun
5 de genoma inteiro

gi|147769864|emb|AM456337.2|[147769864]

Vitis vinifera contig VV78X219892.2, sequência de shotgun
de genoma inteiro

gi|147780236|emb|AM461946.2|[147780236]

10 Vitis vinifera, sequência de shotgun de genoma inteiro, contig
VV78X014445.8, clone ENTAV 115

gi|123704690|emb|AM483793.1|[123704690]

Vitis vinifera contig VV78X193742.9, sequência de shotgun
de genoma inteiro

15 gi|147768076|emb|AM435996.2|[147768076]

Lotus japonicus DNA genômico, cromossoma 2, clone:
LjB06D23, BM0787, sequência completa

gi|37591131|dbj|AP006541.1|[37591131]

20 Agropyron cristatum pseudogene da subunidade da glutelina
de peso molecular alto tipo Bsil y isolado, sequência completa

gi|71159564|gb|DQ073532.1|[71159564]

Agropyron cristatum pseudogene da subunidade da glutelina
de peso molecular alto tipo Btil y isolado, sequência completa

gi|71159568|gb|DQ073535.1|[71159568]

25 Agropyron cristatum pseudogene da subunidade da glutelina
de peso molecular alto tipo y Bfil isolado, sequência completa

gi|71159563|gb|DQ073531.1|[71159563]

Pinus taeda gene da proteína da parede celular putativa (1p5),
cds completa

gi|2317763|gb|AF013805.1|[2317763]

Brassica rapa subsp. pekinensis clone KBrH011G10,
sequência completa

gi|110797257|gb|AC189577.1|[110797257]

5 Brassica rapa subsp. pekinensis clone KBrB032C14, sequência
completa

gi|110796986|gb|AC189306.1|[110796986]

Brassica rapa subsp. pekinensis clone KBrB011P07, sequência
completa

10 gi|110744010|gb|AC189225.1|[110744010]

Choupo sequências de cDNA

gi|115416791|emb|CT029673.1|[115416791]

Choupo sequências de cDNA

gi|115416790|emb|CT029672.1|[115416790]

15 Coffea arabica DNA de microssatélite, clone 26-4CTG

gi|13398992|emb|AJ308799.1|[13398992]

Medicago truncatula clone mth2-34m14, sequência completa

gi|61675739|gb|AC126779.19|[61675739]

Medicago truncatula cromossoma 5 clone mth2-5p5,

20 SEQUÊNCIA COMPLETA

gi|119359633|emb|CU302347.1|[119359633]

Medicago truncatula cromossoma 8 clone mth2-14m21,
sequência completa

gi|50355770|gb|AC148241.21|[50355770]

25 Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1035BCO2, HTC
em folha

gi|148538338|dbf|AK247104.1|[148538338]

Mimulus guttatus clone MGBa-44P14, sequência completa

gi|150010729|gb|AC182564.2|[150010729]

Mimulus guttatus clone MGBa-64L10, sequência completa

gi|154350257|gb|AC182570.2|[154350257]

Selaginella moellendorffii clone JGIASXY-5119, sequência

completa

5

gi|62510100|gb|AC158187.2|[62510100]

M. truncatula DNA sequência do clone MTH2-170H18 no

cromossoma 3, sequência completa

gi|115635794|emb|CT967314.8|[115635794]

Vigna unguiculata mRNA de glutelina 2, cds parcial

10

gi|4973069|gb|AF142332.1|AF142332|[4973069]

Tabela 7

clones de cDNA da Soja

gb|CX711863.1|CX711863
 gb|BM525343.1|BM525343
 gb|BG156297.1|BG156297
 gb|BM308148.1|BM308148
 gb|AI856660.1|AI856660
 gb|BF596520.1|BF596520
 gb|BI472193.1|BI472193
 gb|CO982042.1|CO982042
 gb|BM143278.1|BM143278
 gb|AW831270.1|AW831270
 gb|BE329874.1|BE329874
 gb|BG652163.1|BG652163
 gb|BI967821.1|BI967821
 gb|BI321493.1|BI321493
 gb|BU546579.1|BU546579
 gb|CO984945.1|CO984945
 gb|DW247614.1|DW247614
 gb|BG726202.1|BG726202
 gb|BI968915.1|BI968915
 gb|BG043212.1|BG043212
 gb|BG510065.1|BG510065
 gb|BG043153.1|BG043153
 gb|AW832591.1|AW832591
 gb|AI856369.1|AI856369
 gb|BI699452.1|BI699452
 gb|BG650019.1|BG650019
 gb|AW234002.1|AW234002
 gb|AW310220.1|AW310220
 gb|AW394699.1|AW394699
 gb|AW832462.1|AW832462
 gb|AW459788.1|AW459788
 gb|BM731310.1|BM731310
 gb|BI317518.1|BI317518
 gb|AI988431.1|AI988431
 gb|CA801874.1|CA801874
 gb|BE057592.1|BE057592
 gb|AW102002.1|AW102002
 gb|CA938750.1|CA938750
 gb|AW397679.1|AW397679

Tabela 8

	emb CA040855.1 produto de proteína não denominada [Vitis vinifera]
5	gb EAY88740.1 proteína hipotética Os1_009973 [Oryza sativa (grupo do cultivar indica)]
	gb EAZ25768.1 proteína hipotética OsJ_009251 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]
10	ref NP_001049123.1 Os03g0173900 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]
	emb CA021927.1 produto de proteína não denominada [Vitis vinifera]
	emb CAD41576,3 OsJNBa0088122.8 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]
15	gb EAY95219.1 proteína hipotética Os1_016452 [Oryza sativa (grupo do cultivar indica)]
	emb CAH67282.1 OsIGBa0111L12.9 [Oryza sativa (grupo do cultivar indica)]
	ref NP_001053604.1 Os04g0571200 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]
20	ref NP_001063719.1 Os09g0525400 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]
	gb EAZ09811.1 proteína hipotética Os1_031043 [Oryza sativa (grupo do cultivar indica)]
25	gb EAZ45411.1 proteína hipotética OsJ_028894 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]
	ref NP_001062434.1 Os08g0548300 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]
	gb EAZ07897.1 proteína hipotética Os1_029129 [Oryza sativa (grupo do cultivar indica)]

- ref|NP_001063778.1|Os09g0535100 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]
- emb|CAC10211.1| proteína hipotética [Cicer arietinum]
- emb|CA044394.1| produto de proteína não denominada [Vitis
- 5 vinifera]
- gb|ABG73441.1|proteína da família do tipo C3HC4 de dedo de zinco [Oryza brachyantha]
- ref|NP_001056653.1|Os06g0125800 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]
- 10 gb|EAZ09879.1| proteína hipotética Os1_031111 [Oryza sativa (grupo do cultivar indica)]
- gb|EAZ45482.1| proteína hipotética OsJ_028965 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]
- dbj|BAD82497.1|Proteína de dedo de RING-H2 equivalente a
- 15 RHG1a [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]
- emb|CAN71989.1| proteína hipotética [Vitis vinifera]
- dbj|BAD05399.1| Equivalente à proteína de dedo de zinco que liga DNA [Oryza sativa (japonica
- emb|CAH65886.1|OsIGBa0148J22.5 [Oryza sativa (grupo do
- 20 cultivar indica)]
- emb|CAE02518.2|OsJNBb0003A12.5 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]
- ref|NP_001052192.1|Os04g0185500 [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]
- 25 emb|CA071872.1| produto de proteína não denominada [Vitis vinifera]
- emb|CAO39354.1| produto de proteína não denominada [Vitis vinifera]
- emb|CAE01827.2|OsJNBa0041A02.20 [Oryza sativa (grupo

do cultivar japonica)]

emb|CA071869.1| produto de proteína não denominada [Vitis
vinifera]

emb|CAA85320.1|dedo de zinco de terminal C [Glycine max]

5 gb|EAZ08608.1| proteína hipotética Os1_029840 [Oryza sativa
(grupo do cultivar indica)]

gb|EAY75305.1| proteína hipotética Os1_003152 [Oryza
sativa (grupo do cultivar indica)]

10 ref|NP_001043810.1|Os01g0667700 [Oryza sativa (grupo do
cultivar japonica)]

dbj|BAD73651.1|equivalente à proteína de dedo de zinco
RING [Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)]

emb|CA071875.1| produto de proteína não denominada [Vitis
vinifera]

15 ref|NP_001062870.1|Os0990323100 [Oryza sativa (grupo do
cultivar japonica)]

gb|EAZ35180.1| proteína hipotética OsJ_018663 [Oryza sativa
(grupo do cultivar japonica)]

20 dbj|BAA74802.1| proteína de dedo de zinco que liga DNA
(Pspzf) [Pisum sativum]

ref|NP_001056239.1|Os05g0550000 [Oryza sativa (grupo do
cultivar japonica)]

gb|EAY98923.1| proteína hipotética Os1_020156 [Oryza
sativa (grupo do cultivar indica)]

25 emb|CAN83345.1| proteína hipotética [Vitis vinifera]

emb|CAO43928.1| produto de proteína não denominada [Vitis
vinifera]

emb|CAN79375.1| proteína hipotética [Vitis vinifera]

Tabela 9 polipeptídeos BB identificados pelo Blastp

	Ref NM_001055658.1 Oryza sativa (grupo do cultivar japónica) Os03g0173900 (Os03g0173900) mRNA, cds completa
	dbj AK063978.1 Oryza sativa (grupo do cultivar japónica)
5	clone de cDNA: 001-124-008, sequência de inserto completa
	dbj AP006425.1 Lotus japonicus DNA genômico, cromossoma 1, clone: LjT39B10, TM0315, sequência completa
	gb AY110224.1 Zea mays CL5837_1 sequência de mRNA
10	ref NM_001060139.1 Oryza sativa (grupo do cultivar japónica) Os04g0571200 (Os04g0571200) mRNA, cds parcial
	dbj AK071401.1 Oryza sativa (grupo do cultivar japónica)
	clone de cDNA: J023097G23, sequência de inserto completa
	ref NM_001068969.1 Oryza sativa (grupo do cultivar japónica) Os08g0548300 (Os08g0548300) mRNA, cds completa
15	dbj AK073266.1 Oryza sativa (grupo do cultivar japónica)
	clone de cDNA: J033029A20, sequência de inserto completa
	emb CT832808.1 Oryza sativa (grupo do cultivar indica) clone de cDNA: OSIGCSNO35L02, sequência de inserto completa
	ref NM_001070254.1 Oryza sativa (grupo do cultivar japónica) Os09g0525400 (Os09g0525400) mRNA, cds completa
20	dbj AK104112.1 Oryza sativa (grupo do cultivar japónica)
	clone de cDNA: 006-202-G09, sequência de inserto completa
	dbj AK066238.1 Oryza sativa (grupo do cultivar japónica)
	clone de cDNA: J013059J01, sequência de inserto completa
25	emb CT832015.1 Oryza sativa (grupo do cultivar indica) clone de cDNA: OSIGCRA126H24, sequência de inserto completa
	dbj AK250973.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare clone de cDNA: FLbaf101a03, sequência de mRNA
	dbj AK249803.1 Hordeum vulgare subsp. vulgare clone de

cDNA: FLbaf58c16, sequência de mRNA

emb|CT832014.1|Oryza sativa (grupo do cultivar indica) clone
de cDNA: OS1GCRA115D08, sequência de inserto completa

gb|BT016451.1|Zea mays sequência de mRNA clone

5 Contig284

bem|AJ299062.1|CAR299062 Cicer arietinum mRNA parcial
para a proteína hipotética (ORF1), clone Can183

gb|AY109631.1|Zea mays CL5026 1 sequência de mRNA

gb|AY108288.1|Zea mays PC0148716 sequência de mRNA

10 ref|NM_001070313.1|Oryza sativa (grupo do cultivar
japonica) Os09g0535100 (Os09g0535100) mRNA, cds completa

dbj|AK069888.1|Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)
clone de cDNA: J023039004, sequência de inserto completa

gb|AY103990.1|Zea mays PC0093361 sequência de mRNA

15 emb|AM485242.1|Vitis vinifera, sequência de shotgun de
genoma inteiro, contig VV78X218805.2, clone ENTAV 115

gb|BT018037.1|Zea mays clone ELO1N0530G02.c sequência
de mRNA

20 emb|CT829435.1|Oryza sativa (grupo do cultivar indica) clone
de cDNA: OSIGCRA107A15, sequência de inserto completa

ref|NM_001063188.1|Oryza sativa (grupo do cultivar
japonica) Os06g0125800 (Os06g0125800) mRNA, cds completa

gb|AY225189.1| Oryza sativa (grupo do cultivar indica)
mRNA da proteína de dedo de zinco, cds completa

25 gb|AY207044.1|Oryza sativa (grupo do cultivar indica) mRNA
da proteína de dedo de zinco, cds completa

dbj|AK104425.1|Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)
clone de cDNA: 006-205-F10, sequência de inserto completa

dbj|AK068302.1|Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)

clone de cDNA: J013144A04, sequência de inserto completa

gb|AY112568.1| Zea mays CL32837_1 sequência de mRNA

emb|AM453896.2| Vitis vinifera contig W78X100953.6,
sequência de shotgun de genoma inteiro

5 gb|AC157490.18|Medicago truncatula clone mth2-123f23,
sequência completa

gb|AC151824.13|Medicago truncatula clone mth2-45n18,
sequência completa

10 ref|NM_001058727.1|Oryza sativa (grupo do cultivar
japonica) Os04g0185500 (Os04g0185500) mRNA, cds completa

gb|BTO19187.1|Zea mays clone Contig858.F sequência de
mRNA

dbj|AK064939.1|Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)
clone de cDNA: J013000P06,

15 gb|AY110468.1|Zea mays CL16240_2 sequência de mRNA

gb|AY110685.1|Zea mays CL9024_1 sequência de mRNA

dbj|AK246964.1|Solanum lycopersicum cDNA, clone:
LEFL1004CA06, HTC em folha

dbj|AP008214.1|Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)

20 DNA genômico, cromossoma

ref|NM_001050479.1| Oryza sativa (grupo do cultivar
japonica) Os01g0692700 (Os01g0692700) mRNA, cds parcial

dbj|AK065626.1|Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)
clone de cDNA: J013028F14,

25 dbj|AP004704.31 Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)

DNA genômico, cromossoma 8, clone PAC: P0544G09

dbj|AP006265.2|Oryza sativa (grupo do cultivar japonica)

DNA genômico, cromossoma 8, clone BAC: OJ1112_E06

Tabela 10 ácido nucleico que codifica polipeptídeos BB identificados pelo tBlastn

	Comprimento	Domínios de Função
DA1	532 aa	Dois UIM, Um LIM
DAR1	548 aa	três UIM, um LIM
DAR2	529 aa	Um LIM
DAR3	451 aa	Nenhum
DAR4	1614 aa	um NB-ARC, um LRR3, três LRR1, um LIM
DAR5	703 aa	Um RPW8, um LIM DARE 645aa Sete UIM, um LIM
DART	561 aa	Três UIM, um LIM

Tabela 11

Análise	AtDA1	BrDA1a	BrDA1b	OsDA1
Comprimento	533 aa	533 aa	515 aa	487 aa
Peso Molecular	60470,46	60185,30	59041,38	55268,94
Ponto isoelétrico	5,98	5,89	5,96	6,08
Carga no pH 7	-12,15	-13,24	-13,04	-8,57

Tabela 12

Sequências

MGWFNKIFKGSNQRLRVGNKHNHNVYYDNYPTASHDDEPSAADTDADNDEPHHTQEPST
 SEDNTSNDQENEDIDRAIALSLLEENQEQTSGKYSMPVDEDEQLARALQESMVVGNSP
 RHKSGSTYDNGNAYGAGDLYGNHMYGGGNVYANGDIYYPRPITFQMDFRICAGCNMEIG
 HGRFLNCLNSLWHPECFRCYGCSQPISEYEFSTSGNYPFHKACYRERYHPKCDVCSHFIP
 TNHAGLIEYRAHPFWVQKYCPSHEHDATPRCCSCERMEPRNTRYVELNDGRKLCLECLDS
 AVMDTMQCQPLYLQIQNFYEGLNMKVEQEVPLLLVERQALNEAREGEKNGHYHMPETRGL
 CLSEEQTVSTVRKRKSKHGTGKWAGNITEPYKLTRQCEVTAILILFGLPRLLTGSILAHM
 MHAWMRLKGFRTLSQDVEEGICQVMAHKWLDLAAGSTNSNAASSSSSSQGLKKGPRSQ
 YERKLGEFFKHQIESDASPVYGDGFRAGRLAVHKGRLRKTLEHIQMTGRFPV

SEQ ID NO: 1

atggggttggtttaacaagatctttaaggctctaaccaaaggctccgggttggaataat
aagcacaatcacaatgtttattacgataattatccgactgcttcacatgatgatgagcct
agtgcggcgatacagatgctgataatgatgaacctcatcactcaggaaccatctaca
tctgaggataatacatcgaatgaccaggaaaatgaagacatagaccgtgcaattgcattg
tcgcttttagaagagaatcaagaacagacaagtataagcgggaaatactcgatgccggtg
gatgaagatgagcaacttgctagagccctacaagaaagtatggtagttggaattcaccc
cgtcacaaaagtgggaagtacatatgataatgggaatgcataatggagctggagatttatat
gggaatggacatatgtatggaggaggaaatgtatatgcaaattggagatatattattacca
agacctattacttttcaaattggatttcaggatttgtgctggctgtaatatggagattggc
catggaagatttctgaattgccttaattcactatggcatccagaatgttttcgatgttat
ggctgcagtcagccgatttctgagtaacgagttttcaacatcagggaactaccctttcac
aaggcttggttacaggaggagatatcatcctaaatgtgatgtctgcagccactttatacca
acaaatcatgctggtcttattgaatatagggcacatcctttttgggttcagaagtattgt
ccttctcacgaacacgatgctaccccgagatgttgagttgtgaaagaatggagccacgg
aatacgagatatgttgaaacttaacgatggacggaaactttgccttgagtgtttggactcg
gcggtcatggacaccatgcaatgccaacctctgtacttgcaatacaaaatttctatgaa
ggactcaacatgaaggtagagcaggaagttccactcctcttggttgagagacaagcactt
aacgaagccagagaaggtgaaaagaatggctactatcacatgccagaaacaagaggactc
tgcctttcagaagaacaaactgttagtactgtaagaaagcgatcaaagcatggcacagga
aaatgggcccgggaatattacagaaccttacaagttaacacggcaatgtgaagttaccgcc
attctcatcttattcgggctccctaggttacttactgggttcgattctagctcatgagatg
atgcatgcgtggatgaggctcaaaggattccgaacactgagccaagatgttgaagaaggt
atatgtcaagtgatggctcataaatgggttagatgctgagttagctgctgggttcaacaaat
agcaatgctgcatcatcctcctcttctcaaggactgaaaaagggaccgagatctcag
tacgagagaaaagcttggtgagttttcaagcaccaaatcgagtctgatgcttctccggtt
tatggagacgggttcagagctgggaggttagctgttcacaagtacgggtttgcgaaaaaca
cttgagcatatacagatgaccggtagattcccgggttaa

SEQ ID NO: 2

p---pLpbA1 pb.Sbp-.pp p

SEQ ID NO: 3

p---pLpbA1 pb.Sbp-spp p

SEQ ID NO: 4

pCs.CscsIh s.....bhlp tb.sp.aH.. .pCFpCs..p CppsLss... .p.ab.pcsp
baCpps...

em que;

c é um resíduo de aminoácido carregado, por exemplo, D, E,

H, K, R;

p é um resíduo de aminoácido polar, por exemplo, C, D, E, H,

5 K, N, Q,

R, S ou T;

h é um resíduo de aminoácido hidrofóbico, por exemplo, A, C,

F, G, H,

I, L, M, T, V, W e Y;

t é um resíduo de aminoácido minúsculo, por exemplo, A, G

ou S

5

a é um resíduo de aminoácido aromático, por exemplo, F, H,

W ou Y;

b é um resíduo de aminoácido grande, por exemplo, E, F, H, I,

K, L, M, Q, R, W ou Y;

s é um resíduo de aminoácido pequeno, por exemplo, A, C, D,

10

G, N, P, S, T ou V;

l é um resíduo de aminoácido alifático, por exemplo, I, L ou V;

. é ausente ou é qualquer aminoácido; e

- é qualquer aminoácido.

SEQ ID NO: 5

QENEDIDRAIALSLLEENQE

SEQ ID NO: 6

DEDEQIARALQESMVVGNSP

SEQ ID NO: 7

ICAGCNMEIGHGRFLNCLNSLWHPECFRCYGCSPISEYEFSTSGNYPFHKAC

SEQ ID NO: 8

```

1 mngdnrpved ahytetgfpv aatgsymdfy ggaaggplny dhaatmhpqd nlywtmntna
61 ykfgfsgsdn asfygsydmn dhlsrmsigr tnwdyhpvn vaddpentva rsvqigdtde
121 hseaeecian ehdpdpqvs wqddidpdtm tyeelevelge avgtesrgls qelieltptk
181 kykfgsifsr kragercvic qlkykigerq mnlpckhvyh seciskwlsi nkvcpcvncse
241 vfgepsih

```

SEQ ID NO: 9

```

1 acactctttc ctctctcttt cttctctctt tctttctctt ctctctcttc tgctctctcg
61 tctctctgtc acagtgcctt cgcctcacc ttttctcttg tcctatgaat ttggtcgaaa
121 tgccctcttc ctctctcttc ttccactaat ctcaaaagat atatccttcg agactctccc
181 ttgcgctctc caattgcac tcaccgctcc aactctcttc gaattagctg aatgaatgg

```

```

241 agataataga ccagtggag atgctcatta cacggagaca ggtttccctt atgctgctac
301 tgggaagtac atggactttt atgggtggtgc ggctcagggg cctcttaact acgatcatgc
361 cgcaactatg catcctcagg acaatctgta ctggaccatg aataccaatg catacaagtt
421 tgggttttca ggatcagata atgcttcttt ctatggttca tatgacatga acgatcattt
481 atcgaggatg tccatagggg gaacaaattg ggactatcat cccatgggtg acgttgctga
541 tgatcctgaa aacacagttg cacgttccgt ccaaatecga gacacagatg agcactctga
601 agctgaagaa tgcattgcaa atgagcatga tcccgacagt cctcaggtat cctggcaaga
661 tgacattgat cctgatacaa tgacctatga ggaattagta gagctggggg aagcagtagg
721 aacagaaagc aggggggtgt ctcaggaact catagaaacg cttcccacta aaaagtataa
781 gtttgggagc atcttctcca ggaaaagagc tggggagagg tgtgtgatat gccagctcaa
841 gtacaagata ggggagaggc aaatgaatct gccgtgcaag catgtgtatc attctgaatg
901 catttccaaa tggctaagca tcaacaaggt ttgcccgtg tgtaacagcg aggtctttgg
961 ggagcccagc attcattgat cggcacaagg ggctcctcct cttcttttct ttttggcttt
1021 ttatatcgag gctcatcaag taattgtttt agtgtagtga aaaccccaaa aaatagtcta
1081 aaagatgtcc acactatact ctctcatgtt cagtccttct ctgtacatgt aatttttctt
1141 ctagtcccat tttcgcttgt gtgtgcttta agtttaacag tcactcgtat tgtatactaa
1201 atgctaagtc aaaaacgctg aatccatat

```

SEQ ID NO: 10

```

1 atggcctact cctcacggtc ttgtgatcag tgcagtcacg agaggagatc cggcttcatg
61 aagtggctct gcgctttcct gaaggggagc aaggacggcg aggccaaaccg acggcgccct
121 cgggtgacgg caggagaaga gaccacgctc tgggaagaac cagttagacc aaagaaggaa
181 gaaccaccta gacataacaa tgaagaaatg gaccatgcac ttgcccttgc tcttgagac
241 gatgccaaaa atacaaaaga gagaaaccaa gacaaggagag aaaacgatga agaactcgct
301 agagcaatac aggacagtct gaacatgaat ccttaccagc cttacaatcc ttgtgacccc
361 tctcagaccc aggccaggtc gagaggatac agggctctgtg ggggttgcaa gcatgagata
421 gggcatggcc attacttgag ctgcttgagg atgtactggc accctcagtg cttccgctgt
481 tcttctctgt gccaccctat ccgtgagatg gagttcacct tgctaggtag agatccatac
541 cacaagctgt gctacaagga gcttcatcac ccaaagtgtg acgtctgcct tcaatttatc
601 ccaacgaaca ggactggttt gatagagtac agagcccatc cattctgggg acagaagtat
661 tgtcctttgc atgagcatga tagaacacct cgttgctgta gctgtgagaa aatggagcca
721 aggaacacaa agtatatgtc attaggggat ggacgcagct tgtgcatgga atgcctggat
781 tctgcaatca tggacaccgg tgaatgtcaa ccgctatacc attccatcag agactactac
841 gaagggatga acatgaaact agaccagcag ataccatgc tcttggttga acgtcaagcc
901 cttaatgaag ctatggaagg agaaagcaaa ggaccgcac atatgcctga aacacgaggc
961 ctttgtctgt cagaggagca gactgtgacc agtatactta ggaggcccag aattgggtga
1021 aatcggttac tagatatgaa aacccaaccg caaaagctaa ctaggagatg cgaagtcact
1081 gcaattcttg tattgtttgg cctccccagg ctgctaaccg gctccattct tgcccagtaa
1141 ttgatgcatg ggtggttgcg cctcaaaggc taccggaacc taaaggcgga gattgaggaa
1201 ggtatatgcc aggtcatgtc ttacctgtgg ctggagtcag agatccttcc atccacttca
1261 agatatggac aggtctcaac atcttacgct tcatcttcgt cgtcctctcg tcgaccacca
1321 ccgtccaaga aggggtggat ctctcacacc gagaagaagc ttggagaatt cttcctgcat
1381 cagatcgcca atgacacatc atcagcatac ggcatgggtt tcagagctgc ctatgcagct
1441 gtgaacaagt atggccttcg ccaatcactg aaccatatac ggctaaccgg aggccttctc
1501 gtgtaa

```

SEQ ID NO: 11 (OsDAR2)

```

1  atggagtttc  ttcttctctt  gtttggatac  attaagaatg  tgtttctctt  tgcaggtaag
61  aggttggtgt  tgatgccaat  ggggtggctt  actaagatcc  ttaaagggtc  tagtcataag
121  tattcagatg  gtcaagctaa  cagaagatac  aatagagagg  atagaagcct  ggacactcct
181  cgttattccg  cggaaggatc  tgattttgac  aaagaagaaa  ttgaatgcgc  cattgcactc
241  tccctttctg  aacaagaaca  tgtgattcca  caagatgaca  aaggaaagaa  agtcatcgga
301  atacaaatct  gaaactgaag  aagatgatga  tgaggatgag  gatgaggatg  aggaggatga
361  tgatgaagaa  cacatgagag  cttaggtgga  agcagcagaa  gaagaggaaa  agaaggtagc
421  tcaagctcaa  atagaggaag  aagagaaacg  aagagctgaa  gaagctgagc  tagaagagtt
481  agagaaacag  cttgccaaag  cttagactaga  agaggaagaa  gttagacgcg  ccaaagctca
541  acttgaggaa  gatgagcagc  tcgcaaaggc  tattcaagaa  agtatgaatg  tgggatctcc
601  tcttcttgga  tatgattctg  gaagtgtgtt  tccatcatac  cccttctctg  tctcttctag
661  agaatatgca  ctggttgccg  agctgagatt  ggacatggaa  ggtttctgag  ttgcatgggt
721  ggcgtttggc  atcctgaatg  tttttgtgct  cacgcttctg  ataagcccat  catagactgt
781  gaggtgttct  caatgtcagg  aaaccgtcct  tatcacaac  tgtgttacaa  ggagcagcat
841  catccaaaat  gtgatgtttg  tcataacttt  attcctacaa  atccagctgg  tctcattgag
901  tacagggcac  atcccttttg  gatgcagaag  tattgtcctt  cacatgagcg  tgatggaaca
961  cctagatgct  gcagctgtga  gcgcatggag  ccgaaagata  caaagtatct  gatacttgat
1021  gatggtagaa  aactgtgtct  tgaatgtcta  gactcagcca  ttatggacac  taatgaatgc
1081  caaccgttgt  atctcgagat  acgtgagttt  tatgaaggct  tgcacatgaa  agtggaaacag
1141  cagataccta  tgctcttggt  ggagagatca  gctttaaacg  aagctatgga  aggagagaaa
1201  catggacatc  atcacttacc  tgagactaga  ggactctgtt  tgtctgaaga  acaaactgtc
1261  acaacagtgt  tgaggagacc  aaagattggg  gcaggctaca  agttgataga  catgatcact
1321  gagccttgca  ggctggtgct  ccgttgtgaa  gtcactgcta  ttctcatctt  atatggactt
1381  ccccgctgtt  gttaactgga  tcaatcctag  ctcatgagat  gatgcatgca  tggcttcgac
1441  taaatggggt  atccaaatct  tagaccagaa  gtggaagaag  ggatatgtca  ggttttagct
1501  cacatgtggt  tggaaatctga  gacttatgct  ggctctacat  tgatagatat  tgcactctct
1561  tcttcgtctt  catcatcagc  cgctgtggcg  attgcatcgt  ccaagaaagg  tgagaggtct
1621  gattttgaga  agaaactcgg  tgagtttttc  aagcaccaga  tagagtcaga  ttcttcttcg
1681  gcatatgggg  atgggttcag  gcaaggtaac  caagctgttc  ttacgcattg  tctgaagcga
1741  acccttgatc  atattcgctt  gaccggtaac  tttccttaa

```

SEQ ID NO:12 (BrDAR1)

```

1  atggattctt  ctccatatgg  tgtttctcat  gtcagccata  tctccaatcc  ttgtatcttt
61  ggggctgggt  cgctgctctt  gccagagaag  aaatggaact  tgatgaaatg  ggtgagtaaa
121  cttttcaaga  gtggctctaa  cggtggaact  ggtggtgctc  gcactaacgg  tcatcctcct
181  cagtttcaag  aggacgagaa  tatggtcttt  cctttacctc  ctctctcttc  ggacgatcgg
241  tcgagagcct  cacgggacaa  agaagaacta  gatcgtgcat  tgtcagtttc  tctagctgac
301  gatacgaacc  gaccatatgg  atatggttgg  tctatggata  ataattcaga  ttccctagg
361  ccttttcaca  gtggattgaa  tccatctttc  attccacctt  atgaaccgtc  ctatcaagtc
421  agacgaccac  aaagaatatg  tggcggttgc  aatagcgata  ttggattggg  gaactatctg
481  ggatgcattg  gaacattctt  tcactctgat  tgcttctggt  gtgattcatg  tctgtaccct
541  atcactgagc  atgagttctc  tctatcagga  accaaacctt  accatcagat  ttgtttcaaa
601  gagctcactc  atcctaaatg  cgaagtttgt  caccatttta  tcccaactaa  tgatgctggc
661  ttgatcgaat  atcgatgcca  tccgttttgg  aacaaaaagt  attgcccctc  tcacgaacac
721  gatagaaccg  ctggttgctg  tagctgcaaa  cggttgaggt  catgggaggt  gagatattac
781  acgttagacg  atggggagaag  tttatgttta  gaatgcatgg  aaactgcatg  aaccgacact
841  ggagattgtc  aaccacttta  ccatgcaata  cgtgactatt  acgaaggaat  gtacatgaaa
901  cttgagcaac  aaatcccat  gcttcttgtt  cagcgagaag  ctctcaacga  cgctatcgtc
961  ggagagaaac  acggatacca  tcacatgcct  gagacaaggg  gtttatgttt  gtctgaagaa
1021  caaacagtca  caagtgttct  taaaagaccg  agactgggcg  ctacccgtct  tgttggtagt
1081  agaactcagc  ctcaaaagct  tacacgtaaa  tgtgaagtca  ctgagattct  cgttctttac
1141  ggctcccta  gactattaac  tggagcaatt  cttgcccacg  agctgatgca  tggatggcta
1201  aggtcctaa  ggtataggaa  ccttaaccct  gaggtagagg  aaggatctg  ccaagctctc
1261  tcttacatgt  ggcttgaatc  tgaagttctc  tcagatcctt  cttcaagaag  catgccccta
1321  acatcaactg  ccacctcgtc  atcatcatca  tcatcatctt  cttctaacaa  gaaaggaggg
1381  aaaacaaacg  tggagaagaa  acttgagag  ttctttaagc  atcagatagc  tcatgacgca
1441  tctcctgctt  acggaggggg  ttccagagca  gcaaatgcag  cggtttgtaa  gtacgggtctg
1501  cgctgcacac  ttgatcatat  ccgcttcact  ggaacgtttc  ctttgtaa

```

SEQ ID NO:13 (BrDAR2)

1 atgccattga gagtgacata tctgatggaa gatcggaaaa gaaaaaggaa aaagcttttt

61 gatttgggca gggacttaa ccttaaacct gcaggatcct tttgaagctg aaactgatat
 121 cgtcaaaaca gtgtcatcga atgatgctca cgttcaagaa gatgaacagc ttgctttggc
 181 cattcaaaaa tctaaagaag acgaagagga aagaaggccc accagggact tagaagagca
 241 tgcacatgag agaggagaaa ggcaaaataa ttatgacaac tcttcttctt tgaaagacaa
 301 aaaagaagga cagacttctg aggagaaaac atgacaacat ttctcttgaa gctcgcttgg
 361 atgagaatga ggagcagcgg attatctggg agagtttgaa ggataaaggt caaacaagc
 421 catctgaaga tgaggctcatt cctcctcgtg gagcaagtgt ggtggttgcc actctgagat
 481 tgaacaagga ggatcagtgg atgtctttgg tgttccttgg catcctgaat gtttctcttg
 541 tgggtgcttgc cgtaacccaa ttgctgtcca cgagggttcaa aacctatgtct caaactcaag
 601 aggcaagttc cacaaaaact gctataaccg gtactgctat gtctgccaag agaaagttaa
 661 gattagagag tacaatagcc atcctttctg gaaggagata tactgccctg ctacagaaac
 721 tgatggaact cccaagtgtt gcagctgcga gaggctagag cctagagaaa cggagttcgt
 781 aatgctagat gatggaaggt ggctatgtct agaattgtatg gactcagcgg ttatggatac
 841 tgacgaagtc cagcctcttc actttgaaat ccgtgacttc ttccatggct tgttcttgcc
 901 agttgagaaa gagttttctc ttcttttggg ggagaaacaa gccctgaata aagctgagga
 961 ggaagagaag attgtgtcaa aagggccaaa gatgggggag aacaagcagc taacaggaaa
 1021 gaccacggaa tctcaaaggg ttgtgagtgg atgcccggtc actgcaattc tcatcttata
 1081 tggacttcct agaggttact aacaggatct atcatggctc acgagatgat gcatgcttat
 1141 cttagactca atgggacata ataatttgaa caagggtctg gaagaaggaa tatgccaaagt
 1201 gctagggcac atgtggttgg agactcagag atacgcccct attgatgttg ctgcagcttc
 1261 ttcttcttct tctgcaaatg cggcaagaa aggggagtgg tctgaactcg agaagaagct
 1321 ggtggatttt tacaagtatg agatagaaac agatgagtca gctgtctatg gtgaagggtt
 1381 taggaaagtt aactatatgg ttacaaactc cagcctccag gaaacctca aagagattct
 1441 tccccgccgg ggttga

SEQ ID NO:14 BrDAR3-7

1 atggggttggg taaacaagat cttcaaaggc tctaaccaaa ggcacccctt gggaatgaa
 61 cactatcatc ataatggcgg ctattacgag aactaccgcg acgaacattc tgagcctagt
 121 gcagagacag atgctgatca tacgcaggag ccatctactt ctgaggagga gacatggaat
 181 gggaaggaaa atgaagaagt agaccgtgta attgcattgt ctattttaga agaagagaat
 241 caaagaccag agactaatat aggcgcctgg aaacacgcaa tgatggatga cgatgagcaa
 301 cttgctagag ccatacaaga gagtatgata gctaggaatg gaactactta tgactttggg
 361 aatgcatatg ggaatggaca tatgcatgga ggaggcaatg tatatgacaa tgggtgattt
 421 tattatccaa gacctattgc tttctcaatg gacttcagga tctgtgctgg ctgcaatatg
 481 gagattggcc atggaagata tctgaattgc ctcaacgcac tatggcatcc acaatgtttt
 541 cgatgctatg gctgcagtca cccaatctct gagtacgagt tctcaacgctc tgggaattac
 601 ccttttcaca aagcttggtt caggagagagg ttccatccaa aatgtgatgt ctgcagcctc
 661 tttatttcaa caaacctatg tggcttattt gaatatagag cacatccttt ctgggtccag
 721 aagtattgcc cttctcacga acacgatgct acgccaagat gttgcagctg tgaaagaatg
 781 gagccgcgga atacaggata ttttgaactc aacgatggac ggaagctttg ccttgagtgt
 841 ctagactcat cggtagatga cacttttcaa tgccagcctc tgtacttgca gatacaagag
 901 ttctatgaag gacttaacat gacggtagag caggaggttc cacttctctt agttgagcgg
 961 caggcactta acgaagccag agaagggtgaa aggaatggtc actatcacat gccagagaca
 1021 agaggactct gtctgtcgga agaacaaact gttagaactg tgagaaagag atcgaaggga
 1081 aactggagtg ggaatatgat tacagagcaa ttcaagctaa ctcgctgatg cgaggttact
 1141 gccattctca tcttggttgg tctccctagg ctactcactg gttcaattct agctcatgag
 1201 atgatgcacg cgtggatgcg gctcaaaggg ttccggccac ttagccaaga tgttgaagag
 1261 gggaatgtgc aagtgtggc tcataagtgg ttagaagctg agttagctgc tggttcaaga
 1321 aatagcaatg ctgcatcatc ttcacatctt tcttatggag gagtgaagaa gggaccaagg
 1381 tctcagtacg agaggaagct tggtaggttt ttcaagcacc agatagagtc tgatgcttct
 1441 ccggtttatg gagatgggtt cagggccggg aggttagcgg ttaacaagta tggtttgtgg
 1501 agaacacttg agcatatata gatgactggg agattcccgg ttttaa

SEQ ID NO:15 BrDA1b

1 atggggttggg ttaacaagat cttcaaaggc tctaaccaaa ggttccggct tggaatgac

```

61 catgaccaca atggctatta ccagagttat ccacatgatg agcctagtgc tgatactgat
121 cctgatccctg atcctgatcc tgatgaaact catactcagg aacctatctac tcttgaggag
181 gatacatccg gccaggaaaa cgaagacata gatcgtgcaa tgcctatgtc tcttatagaa
241 aacagtcaag gacagactaa taatacatgc gctgccaacg cagggaaagta cgcaatggtg
301 gatgaagatg agcaacttgc tagagccata caagagagca tggtagttgg gaatacaccg
361 cgtcagaagc atggaagtag ttatgatatt gggaaatgcat atggggctgg agacgtttac
421 gggaaatggac atatgcatgg aggtggaaat gtatatgcca atggagatat ttattatcca
481 agacctactg ctttcccaat ggatttcagg atttgtgctg gctgcaatat ggagattgga
541 catggaagat atctgaattg cttgaatgca ctatggcatc cagaatgttt tcgatgttat
601 ggctgtaggc accccatttc tgagtacgag ttctcaacgt ctgggaacta cctttttcac
661 aaagcttggt atagggagag ataccatcca aaatgtgatg tctgcagcct ctttattcca
721 acaaacccatg ctggtcttat tggatatagg gcacatcctt tttgggtcca gaagtattgc
781 ccttctcacg aacacgatgc taccccaaga tgttgcagtt gcgaaagaat ggagccacgc
841 aatacaggat atggtgaact taacgatgga cggaaacttt gccttgaatg tctggactca
901 gcggtgatgg acacttttca atgccaacct ctgtatctgc agatacaaga attctacgaa
961 ggtcttttca tgaaggtaga gcaggacgtt ccacttcttt tagttgagag gcaagcactc
1021 aacgaagcca gagaaggtga aaagaatggt cactatcaca tgccagagac aagaggactc
1081 tgcctttcag aagagcaaac tgtagcact gtaagaaaga gatcgaagca tggcacaggga
1141 aactgggctg ggaatatgat tacagagcct tacaagttga cacgtcaatg cgaggttact
1201 gccattctca tcttggttgg gctccctagg ctactcaccg gttcgattct agctcatgag
1261 atgatgcacg cgtggatgcy gctcaaggga ttccggacgc tgagccaaga cgttgaaaga
1321 ggaatatgtc aagtgatggc tcataagtgg ttggaagcag agttagctgc tggttcaaga
1381 aacagcaatg ttgctcatc ttcacttctt agaggagtga agaagggacc aagatcgag
1441 tacgagagga agcttggtga gtttttcaag caccaaatcg agtctgatgc ttctccggtt
1501 tatggagacg ggttcagggc tgggaggtta gcggttaaca agtatggttt gccaaaaaca
1561 cttgagcata tacagatgac cggtagatcc cgggtttaa

```

SEQ ID NO:16 BrDA1a

```

1 atggggttggg tgaccaaatt ttttagaggt tcaaccaca aaatctcgga agggcaatac
61 cacagcaaac ccgcgaggga gacgatatgg aatggaccct ctaattccgc agtgtgacg
121 gatgtcccgt cagaatttga caatgaagat atcgctcgtg ctatatcact ctctctatta
181 gaggaggaac aaagaaaggg aaaggcaata gaaaaggaca tgcatttggg ggaggatgaa
241 caacttgcaa gagctatcca ggaaggttgg aatggtgaat cgcctcctcg tgcctgtgaa
301 aatggcaacg ccaatggtgg caatatgtat caaccactgc catttatgtt ttcttctgga
361 ttcaggactt gtgccggatg tcacagttag attggtcatg ggcgtttcct tagttgcatg
421 ggagctgttt ggcatccaga atgttttcgc tgtcatgctt gtaatcaacc aatatatgac
481 tatgagttct ccatgtcggg aaaccatcca taccataaaa catgctacaa ggagcgcttt
541 caccocaaat gtgatgtctg caagcaattt attcctacaa atatgaatgg cctgattgaa
601 tatagagcac atcctttctg gttacaaaaa tactgtccat cacatgaggt ggacggtact
661 aatggcaacg gtagttgtga aagaatggag ccaagggaat caagatatgt attgctggac
721 gatggtcgca aactctgcct ggagtgctt gattctgcag ttatggatac gagcgagtgc
781 caacctcttt atcttgaat acaggaattt tatgaaggcc taaatatgaa agtggacaa
841 caagttccct tgcctcttgt agaagacag gctttaaatg aagccatgga aggagagaag
901 actggtcacc accatcttcc agaaacaaga ggtttatgct tatcagaaga gcaactgtc
961 agcacgatat tgaggagacc aagaatggct ggaaataaag ttatggaaat gataacggag
1021 ccatataggt tgactcgtcg atgtgaagt actgcaattc tcattcttta tggctctcca
1081 agatatgtga caggttcaat tttagctcat gagatgatgc atgctgtggt cgcacttaaa
1141 ggatatcgca cacttagtcc agacgtagaa gagggcatat gccagttct tgcctcatg
1201 tggattgagt cagagatcat tgcaggatca ggcagtaatg gtgcttcaac gcttctcatc
1261 tcatcagcat ccacatcatc gaaaaagggg ggaagatctc agtttgagcg aaagcttggg
1321 gattttttca agcaccaaat tgagtcagat acctcaatgg cctatggcga tggttttaga
1381 gctggcaacc gagctgttct tcagtatggt ctaaagcgca cccttgagca tatccggtta
1441 acagggaact tcccattttg a

```

SEQ ID NO:17 OsDA1

Alinhamentos de Sequência

A. sequências de aminoácido (SEQ ID NO: 1) e nucleotídeo (SEQ ID NO: 2) de DA1 e sítios de mutação de da1-1, sod1-1, sod1-2 e sod1-3. Os domínios prognosticados usando-se o software SMART são mostradas.

B. Alinhamento de motivos UIM entre proteínas contendo

motivo UIM diferentes. Os motivos UIM foram prognosticados usando-se o software SMART. As sequência UIM1 (valor E, 6,39e-02) e UIM2 (valor E, 7,34e-02) prognosticadas são mostradas em A.

C. Alinhamento de domínios LIM entre as proteínas contendo o domínio LIM. No domínio LIM, existem sete resíduos de cisteína conservados e uma histidina conservada. O arranjo seguido por estes resíduos conservados é C-x(2)-C-x(16,23)-H-x(2)-[CH]-x(2)-C-x(2)-C-x(16,21)-C-x(2,3)-[CHD]. O domínio LIM (valor E, 3,05e-10) foi prognosticado usando-se o software SMART e é mostrado em A.

D. Alinhamento de DA1 e proteínas relacionadas com DA1 em *Arabidopsis*. As regiões conservadas entre DA1 e DARs estão em suas regiões de terminal C. O alelo *dal-1* tem uma única transição de nucleotídeo G para A no gene Atlg19270 e é prognosticado causar uma mudança de arginina (R) para lisina (K) em um aminoácido conservado na posição 358. Um asterisco indica resíduos de aminoácido idênticos no alinhamento. Dois pontos indicam substituições conservadas no alinhamento e um período indica substituições semi-conservadas no alinhamento.

E: Alinhamentos de aminoácido de proteínas equivalentes a DA1. As sequências de aminoácido de tamanho natural de proteínas equivalentes a DA1 de *Physcomitrella patens* (Pp), *Selaginella moellendorffi* (Sm), *Brassica rapa* (Br), *Arabidopsis thaliana* (At), *Brachypodium distachyon* (Bd) e *Oryza sativa* (Os) foram alinhadas com o parâmetro pré-determinado ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), e editaram parâmetros de demonstração no VektorNTi. A seta vermelha mostra a mutação no alelo *dal-1*. DAL significa equivalente a DA1.

A

cgtyggggaacggttttttcttgga
 gaagaagaagaagagctcaacaagctcaacgacccaaaaaacttcggacacgaagactttt
 taattcatttctcctcttttgggttttttctggttccaaaaatattcgatactctcgatctctt
 ctctcgatcctcattaaataaaaaatcgattttttattcttttttggtagtgacacaaa
 ttttttgactttggattagcgttagaattcaagcacattctgggtttattcgtgtatgagt
 agacattgattttgtcaaagttgcatcttttatataaaaagaagtttaatttctcttttt
 cttttcttttctctttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttga
 agaaaggagagaactaaagagtccttttttgagattcttttgctgcttcccttgcttgatt
 agatcatttttgtgattctggatttttgggggttttctgtaagcttattgggattcttattc
 tgattcaggatttttctcaaggctgcattggcgtatgagcagatagttttatttaggcatt
 atgggttgggttaacaagatctttaaggcttcaaccaaggctccgggttgggaataat
 M G W F N K I F K G S N Q R L R V G N N
 aagacacatcacatgtttattacgataattatccgactgcttcacatgatgatgagcct
 K H N H N V Y Y D N Y P T A S H D D E P
 agtgccggcgatcacagatgctgataatgatgaacctcatcactcaggaacctctaca
 S A A D T D A D N D E P H H T O E P S T
 tctgaggataatatacgaatgaccaggaaaatgaagacatagaccgtgcaattgcatgtg
 S E D N T S N D Q E N E D I D R A I A L

UXI

sod1-1(a)G/E

tcgcttttagaagagaatcaagaacagacaaagtataagcgggaaataactcgatgccgggtg
 S L L E E N O E Q T S I S G K Y S M P V
 gatgaagatgagcaacttggtagagccctacaagaagtagtgtagttgggaattcaccc
 D E D E Q L A R A L Q E S M V V G N S P
 cgtcacaaagtggagatcatatgataatgggaatgcatatggagctggagatttatat
 R H K S G S T Y D N G N A Y G A G D L Y
 gggaatggacatatgtatggaggaggaaatgtatatgcaaatggagatatttattatcca
 G N G H M Y G G G N V Y A N G D I Y Y P
 agacttattacttttcaaatggatttccaggatttggctgctgtaatatggagattggc
 R P I T F Q M D F R I C A G C N M E I G
 catggaagatttctgaattgccttaattcactatggcatccagaatgttttcgatgttat
 H G R F L N C L N S L W H P E C F R C Y
 ggctgcagtcagccgatttctgagtagcaggttttcaacatcagggaaactaccctttcac
 G C S O P I S E Y E F S T S G N Y P F H
 aagcttggttacagggagagatatcatcctaaatgtgatgtctgcagccactttatacca
 K A C Y R E R Y H P K C D V C S H F I P
 acaaatcatgctggtcttattgaatatagggcacatcctttttgggttcagaagtattgt
 T N H A G L I E Y R A H P F W V Q K Y C
 ccttctcacgaacacgatgctaccccgagatggtgcagttgtgaaagaatggagccacgg
 P S H E N D A T P R C C S C E R M E P R
 aatacgagatatgttgaaacttaacgatggacggaaactttgccttgagtggttggactcg
 N T R Y V E L N D G R K L C L E C L D S
 gcggtcatggacaccatgcaatgccaaactctgtacttgcatacaaaaatttctatgaa
 A V M D T M O C Q P L Y L O I O N F Y E
 ggactcaacatgaaggtagagcaggaagttccactcctcttggttgagagacaagcactt
 G L N M K V E O E V P L L L V E R Q A L

UXI

LXI

dal-1(a) (R/K)

aacgaagccagagaaggtgaaaagaatggtcactatcacatgccagaaacaagaggactc
 N E A R E G E K N G H Y H M P E T R G L

(t) (L/F) sod1-2

tgctttcagaagaacaaactggttagtactgtaagaaagcgatcaaagcatggcacagga
 C L S E E Q T V S T V R K R S K H G T G
 aaatgggcccgggaatattacagaaccttacaaagttacacggcaatgtgaagttaccgcc
 K W A G N I T E P Y K L T R Q C E V T A
 attctcatcttattcgggtcccttaggttacttactggttcgattctagctcatgagatg
 I L I L F G L P R L L T G S I L A H E M

sod1-3(T) (Q/.)

atgcatgcgtggatgaggctcaaaggattccgaacactgagccaagatggtgaagaaggt
 M H A W M R L K G F R T L S Q D V E E G
 atatgtcaagtgatggctcataaatgggttagatgctgagttagctgctggttcaacaaat
 I C Q V M A H K W L D A E L A A G S T N
 agcaatgctgcatcatcctcctcttctcaaggactgaaaaaggagacgagatctcag
 S N A A S S S S S S S Q G L K K G P R S Q
 tacgagagaaagcttggtagtttttcaagcaccacaaatcgagctctgatgcttctccggtt
 Y E R K L G E F F K H Q I E S D A S P V
 tatggagacgggttcagagctgggaggttagctgttcacaagtacgggttgcgaaaaaca
 Y G D G F R A G R L A V H K Y G L R K T
 Cttgagcatatacagatgacgggttagattcccggtttaagaacccaaatggacaaggtct
 L E H I O M T G R F P V -
 tctactttatttataggatccttggtagattcctccttatatgctcctaattcttttgggtgg
 aaaatgtactctcgaccatattcttattgtagctctcattcgatgattctttgtattcctc
 tgttaaaatccatcagaatcagattcagtggttttcttctt

Alinhamento B

UIM1

DA1

Q9LM05/295-314

O74423/258-277

VP27_YEAST/258

Q05785/175-194

Q9P2G1/976-995

AAK61871/105-1

16741231/229-2

Q9XTL2/173-192

2623826/295-31

Q9FJX8/64-84

Q9C9U5/139-158

YMI8_YEAST/651

Q9FJX8/119-138

AAK61871/80-99

Q20187/2-21

Q9HCH8/758-777

Q9V8R1/660-679

O81340/323-342

Q9TOE1/138-157

O74749/164-183

O35815/224-243

O82143/323-342

Q9HFR1/208-227

Q9FJX8/146-165

ENSG0000013275

YMI8_YEAST/517

Q9MA77/5-24

Q9V8R1/510-529

AAH11090/250-2

O13821/260-279

O13821/304-323

YMI8_YEAST/583

EP15_MOUSE/878

O35815/329-348

PSD4_ARATH/282

Q9FJX8/38-57

VP27_YEAST/301

O74423/230-249

O82143/291-310

Q9LG27/1615-16

Q9HA18/233-252

O23197/65-84

O45266/382-401

Q9H3M9/215-234

YHA2_YEAST/162

YMI8_YEAST/547

2623826/262-28

Q9HCH8/780-799

O12518/165-184

O75886/165-184

EP15_MOUSE/852

O23197/110-129

Q9HCH8/656-675

Q9TOE1/170-189

Q03291/171-190

PSD4_DROME/212

Q9H3M9/235-252

Q9VS85/226-245

QENEDIDR AL SLLEENQ E

DDTALQO AM SMAQAAQ A

DSEAEQK QL SKEEDEA R

DEEELIRK EL SLKESRN S

SYQDDER EE SRITAEQ D

EDDPNILL QL SLOESGL A

EEEEELIRK AE SLNSCRP S

DEDLOQL SL SROEHEK G

QEEDDIAK EL SLKENKG S

SEEDQIAY RM SLOOMGE E

HEAEOQL QESROEEEE E

EEENQIQL EL SAREDEP A

NVDEDIQL AL SLSEIN -

EEDEELART EE SLKENNR R

TEEEQFAL KM SEQEAARE V

SDDEELQL EI SKKTFKD E

REEQEQQO AQ SLOEQEA W

YVDPDLAM RM SQEQORK F

GDDQDLQL QL SVQDSAK E

IEEEMIRAE EA SKKEAEG S

REEEEQY AL SLSESTA Q

DDEDDLQR AM SROEIDM E

VDDQDLAL QM SVQDAGG S

NMDPELAM RM SLOEAQA Q

NKDEQLAL QE SLNMEEY P

EDDDLIQF QQ SLLEAGT E

ENDIQRI LE SQEAQAR N

QEDEDIKL KM SMQYNPP E

DEDDMIQY EQ SLVETSG A

SEDEDQLAM AY SLSEMEA A

NEDEDIKR EL SLKEMPQ S

DEDEEKRA AI SLEEAQK S

EDDEEFLR RQ SRVEDER R

QEQEDLEL AL SKSEISE A

SEEDVERAT TV SLETAKD S

EDSALIDQ AM SVGDVNM S

QHEADIQK QR SLATHEA E

EEDPDIKAE QE SLREAAE A

ENDPELQRV EE SKROAEE D

DDAQLQO AM SMEEGSS G

QEDDELAQ AL SLGNSSE T

GDDLREOM EE SKRETGG K

FDKEEIEC AL SLSEQEH V

SDSIMKY EL SL LDSKE D

QDEEDFOR EL SRQETNR E

SDDEELQK KM SLFEYEK Q

DEDEQRRR EE SOLIYET Q

SEEAMQO AM SMOMNNT E

KEDDDIKR EL SLOEFNN S

ENDDDIQR SA SRLTAE D

KEDEDIAK EL SLOEQKQ Q

SEEDMIEWAK RE SEREEEQ R

DEDEEYMR LE AAEER R

SEEELAAV EI SKRDASP S

EDDDDIAT TM SLKSAAE E

QDDENIRMO LE SLQELNT N

NEDPELAL RV SMEEQOR R

REDEHLRST EL SMQGGSS N

SDDVRLQL SQ SEQDFKD P

Q05785/206-225	DEDPDFQAM	QL	SKREEEL	K
Q13027/227-246	GDDLRLMOM	EE	SRKGAPS	K
Q88321/285-304	TEEEQIAYM	QM	SLQGAEF	G
Q9LM05/334-353	GDDQDIAY	QM	SMQOAAA	A
Q9V8R1/685-701	QEQEMIEQ	KL	SLQEH--	-
CE17317 B0205-	TEEQQEW	RL	SMQENAP	A
Q9MA26/374-393	EEEEEROR	AA	SLDNNM	K
Q17796/291-310	KEEEDIAL	AT	SOSEAEA	K
Q9D0W4/197-216	SEDEAROR	EL	SLAEAKP	Q
Q9D0W4/221-240	QEEDDIALO	AL	SASEAEY	Q
Q15286/347-366	SEEDMEOA	TM	SLQTVRN	D
Q45266/775-794	IENKMIKLM	KE	SLGSED	G
Q9FJX8/244-263	DEDEQAK	EE	SLKKGQO	I
Q9HFR1/347-366	DEEAATAR	AM	SLGQEE	G
UBPP_HUMAN/97-	DDKDDOR	AL	SLAESNR	A
CE06353 T04C10	SDDARLOM	EE	SOKDADR	L
AAH11090/207-2	GVPDDIALG	EL	SRREQQP	S
Q45266/332-351	FDNIMEA	KQ	SLDLKG	D
Q9LM99/105-124	DEDEQIAR	QE	SMVVGNS	P
Q9FDZ8/140-159	EDDDDDK	AL	SLQGSVA	G
Q9LM99/69-88	QENEDIDR	AL	SLLEENQ	E
PSD4_ARATH/305	DEDDIAL	QM	SMGGEES	S
Q35815/244-263	DEEADIR	QL	SMQSSR	G
ENSG00000132_1	RFEEQRL	EL	SRREQEE	R
Q81340/291-310	DENALQO	AM	SMDEPAS	T
Q9HFR1/321-340	EEDEEKR	AM	SRGEGGD	I
Q9ZPH8/231-250	REDEDIAR	SM	SLAAMS	L
PSD4_DROME/276	TEEAMOR	AL	STETPED	N
Q9VTK7/621-640	NESEMCO	QM	STRDYME	D
Q9NWK2/209-228	EEELQOL	AM	SRREEAEK	P
Consenso /60%	p---pLpbAl	pb	Sbp-	pp p

UIM2

DA1	DEDEQAR	QE. SMVVGNS	P
Q9LM05/295-314	DDTALQO	AM. SMAQAAQ	A
Q9HA18/233-252	GDDLRLQ	EE. SKRETGG	K
Q9V8R1/685-701	QEQEMIEQ	KL. SLQEH--	-
ENSG0000013275	EDDDLQOF	QQ. SLLEAGT	E
CE17317 B0205-	TEEQQIEW	RL. SMQENAP	A
YMI8_YEAST/517	ENDIQIRI	LE. SQEAQAR	N
Q9MA77/5-24	QEDEDKLA	KM. SMQYNPP	E
O74423/258-277	DSEAEROR	QL. SKEEDEA	R
VP27_YEAST/258	DEEELIRK	EL. SLKESRN	S
Q9MA26/374-393	EEEEEROR	AA. SLEDNNM	K
Q9V8R1/510-529	DEDDMIOY	EQ. SLVETSG	A
Q05785/175-194	SYQDDIEK	EE. SRITAQE	D
Q9P2G1/976-995	EDDFNILL	QL. SLQESGL	A
Q17796/291-310	KEEEDIAL	AT. SQSEAEA	K
O23197/65-84	FDKEETEC	AL. SLSEQEH	V
AAK61871/105-1	EEEEELRK	AE. SLNSCRP	S
Q9DOW4/197-216	SEDEATOR	EL. SLAEAKP	Q
AAH11090/250-2	SEDEDQLM	AY. SLSEMEA	A
Q9DOW4/221-240	QEEDDIAL	AL. SASEAEY	Q
O15286/347-366	SEEDMQAR	TM. SLETVRN	D
16741231/229-2	DEDLQQL	SL. SRQEHK	G
O45266/775-794	IENKMIKL	KE. SLGSED	G
O45266/392-401	SDSIMKY	EL. SLDSKE	D
O13821/260-279	NEDEDIKR	EL. SLKEMPQ	S
Q9H3M9/215-234	QDEEDFOR	EL. SRQETNR	E
Q9FJX8/244-263	DEDEQIAR	EE. SLKKGQ	I
Q9HFR1/347-366	DEEAAIAR	AM. SLEGQEE	G
UBPP_HUMAN/97-	DDKDDIOR	AL. SLAESNR	A
CE06353 T04C10	SDDARLOM	EE. SOKDADR	L

YHA2_YEAST/162	SDDEEIQKEE	KM.	SLFEYEK	Q
AAH11090/207-2	GVPDDIALGE	EL.	SRREQQP	S
YMI8_YEAST/547	DEDEQIRRAE	EE.	SOLIJET	Q
O45266/332-351	FDNIMIEAEE	KQ.	SLDLKG	D
Q9XTL2/173-192	QEEDDIARKE	EL.	SLKENKG	S
Q9LM99/105-124	DEDEQIRARE	QE.	SMVVGNS	P
Q9FDZ8/140-159	EDDDDIKKEE	AL.	SLQGSVA	G
2623826/262-28	SEEAMIQOEE	AM.	SMQMNNT	E
2623826/295-31	SEEDQIAYEE	RM.	SLQOMGE	E
O13821/304-323	DEDEEIKRKE	AI.	SLLEAOK	S
Q9HCH8/780-799	KEDDDIKRET	EL.	SLQEFNN	S
Q9FJX8/64-84	HEAEQIDLEE	QE.	SRQEEEE	E
Q9C9U5/139-158	EEENQIQLEE	EL.	SAREDEP	A
Q12518/165-184	ENDDDIQORE	SA.	SRLTAE	D
PSD4_ARATH/305	DEDQDIALAE	QM.	SMSGES	S
Q9LM99/69-88	QENEDIDRE	AL.	SLLEENQ	E
O75886/165-184	KEDEDIARKE	EL.	SLQEOKQ	Q
YMI8_YEAST/651	NVDEDIQLEE	AL.	SLSEIN-	-
EP15_MOUSE/852	SEEDMIEWEK	RE.	SEREEEQ	R
Q9FJX8/119-138	EEDELIARTE	EE.	SLKENNR	R
O23197/110-129	DEDEEYMRQE	LE.	AAEEEEER	R
Q9HCH8/656-675	SEEELIAAVE	ET.	SKRDASP	S
O35815/244-263	DEEADIRRE	QL.	SMQGSSR	G
YMI8_YEAST/583	EDDEEFLREE	RO.	SRVEDER	R
EP15_MOUSE/878	QEQEDIELAE	AL.	SKSEISE	A
Q20187/2-21	SDDEEIQLEE	ET.	SKKTFKD	E
AAK61871/80-99	TEEEQFALAE	KM.	SEQEARE	V
Q9HCH8/758-777	REEQETQOEE	AQ.	SLQEQEA	W
ENSG00000132_1	RFEEQIRLEE	EL.	SSREQEE	R
Q9V8R1/660-679	YVDPDIAMEM	RL.	SQEQRK	F

Q9T0E1/170-189	EDDDDIAT	TM.	SLKSAEE	E
Q35815/329-348	SEEDVIRAT	TV.	SLETAKD	S
Q03291/171-190	QDDENIRMA	LE.	SLQELNT	N
Q81340/291-310	DENALAQO	AM.	SMDEPAS	T
PSD4_DROME/212	NEDPENAL	RV.	SMEEQRQ	R
Q9HFR1/321-340	EEDEEKRA	AM.	SRGEGGD	I
Q81340/323-342	GDDQDIQL	QL.	SVQDSAK	E
Q9ZPH8/231-250	REDEDIAR	SM.	SLEAMSY	L
PSD4_ARATH/282	EDSALIDQ	AM.	SVGDVNM	S
Q9T0E1/138-157	IEEEMIRAR	EA.	SKKEAEG	S
Q35815/224-243	DDEDDIOR	AM.	SRQEIDM	E
Q74749/164-183	REEEEIOY	AL.	SLSESTA	Q
Q9FJX8/38-57	QHEADIQK	QR.	SLATHEA	E
PSD4_DROME/276	TEEAMIOR	AL.	STETPED	N
Q82143/323-342	VDDQDIAL	QM.	SVQDAGG	S
Q9VTK7/621-640	NESEMIQO	QM.	STRDYME	D
Q9HFR1/208-227	NMDPENAM	RM.	SLQEAQA	Q
VP27_YEAST/301	EEDPDIKR	QE.	SLREAEE	A
Q74423/230-249	ENDPENORV	EE.	SKRQAE	D
Q9H3M9/235-252	REDEHIRST	EL.	SMQGSSG	N
Q9VS85/226-245	SDDVRIQL	SQ.	SEQDFKD	P
Q9NWK2/209-228	EEELQIQL	AM.	SREEAEK	P
Q05785/206-225	DEDPDFQA	QL.	SKEEEEL	K
Q82143/291-310	DDAQLIQO	AM.	SMEEGSS	G
Q88321/285-304	TEEEQIAYM	QM.	SLQGAEF	G
Q9LG27/1615-16	QEDDENAO	AL.	SLGNSSE	T
Q13027/227-246	GDDLRIQM	EE.	SRKGAPS	K
Q9FJX8/146-165	NKDEQIALI	QE.	SLNMEEY	P
Q9LM05/334-353	GDDQDIAY	QM.	SMQQAAS	A
Consenso /604	p---pLpbAl	pb.	Sbp-spp	p

Alinhamento C

LIM

DAL	ICAG	H...	GRAN	CE	NNL	P...	M...	Y...	G	MOUSE	...	Y...	STHONY	PHKAC				
CEP25M5_6	ROMA	TKR	GI	GGAL	DIS	FE	DAMN	L	DEH	IA	Q	TS	VG...	KOITIONE	IL	PER		
LIM3-XENLA	FCAL	QOQ	F...	TOT	NR	MO	ETVL	L	NO	I...	V	RRQ	ATG	DRIT	LMDSR	LV	KAD	
DDU83086-1	FCAL	YKTL	C...	ED	TR	TD	KE	N	NO	I...	V	RRQ	ATG	DRIT	LMDSR	LV	KAD	
PINC=HUMAN	VFR	NR	VIE	C...	ED	TR	TD	KE	N	NO	I...	V	RRQ	ATG	DRIT	LMDSR	LV	KAD
CEU73946-1	RSCN	MOD	F...	TOT	NR	MO	ETVL	L	NO	I...	V	RRQ	ATG	DRIT	LMDSR	LV	KAD	
MXU79776-1	TC	NR	KNG	Q	SSA	CO	AL	DSL	T...	C...	VE	C...	S...	ED	TR	TD	KE	N
CEP229F5	KAG	NR	NEEL	RQ	AA	KE	SL	WLF	L	A...	VE	C...	S...	ED	TR	TD	KE	N
HS295381-1	KAG	NR	NEEL	RQ	AA	KE	SL	WLF	L	A...	VE	C...	S...	ED	TR	TD	KE	N
CIF-HUMAN	CEPR	GR	SV	A...	AE	NR	CG	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...	S...
CEU72211-1	CEPR	GR	SV	A...	AE	NR	CG	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...	S...
HS6011610_1	TAAD	COOL	L...	M...	DSR	IF	VE	DA	HE	C...	G...	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...
HS281821_1	CO	NR	SK	F...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...	S...
HSU49957_1	M	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
HSMLN50_1	M	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
CEB0496_9	D	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
HSENIGHA-1	K	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
L111-CAEEL-2	R	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
YH2-CAEEL	C	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
MOUSEHENC=1	L	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
CRIP_PAT	K	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
RNM1_HUMAN-1	G	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
AV07024-1	R	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
SCRGAL1-1	S	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
CET11B7_5	V	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
YH2-CAEEL	L	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
CEP09B9-2	K	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
TR16-HUMAN	K	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
TES2_MOUSE	S	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
MSDRAL-1	K	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
TES2_MOUSE	C	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
CEP707C_2	H	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
YH21-CAEEL	V	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
HS295381-1	V	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	C...
HM14-CAEEL	K	NR	GR	NR	G...	E...	NR	AT	GR	PA	K...	H...	T...	SA...	I...	C...	VE	

Explicação de códigos de cor usados pelo CHROMA

Nome do Grupo	Aminoácidos	Demonstrado com
Default	X	.
Único	X	
Alanina	A	
Cisteína	C	
Ácido Aspártico	D	
Ácido Glutâmico	E	
Fenilalanina	F	
Glicina	G	
Histidina	H	
Isoleucina	I	
Lisina	K	
Leucina	L	
Metionina	M	
Asparagina	N	
Prolina	P	
Glutamina	Q	
Arginina	R	
Serina	S	
Treonina	T	
Valina	V	
Triptofano	W	
Tirosina	Y	
Negativo	D,E	-
Ser/Thr	S,T	*
Alifático	I,L,V	
Positivo	H,K,R	+
Minúsculo	A,G,S	t
Aromático	F,H,W,Y	
Carregado	D,E,H,K,R	c
Pequeno	A,C,D,G,N,P,S,T,V	s
Polar	C,D,E,H,K,N,Q,R,S,T	p
Grande	E,F,H,I,K,L,M,Q,R,W,Y	b
Hidrofóbico	A,C,F,G,H,I,L,M,T,V,W,Y	

Alinhamento D

```

AT1G19270      -----
AT4G36860      -----
AT2G39830      -----
AT5G66620      -----
AT5G66630      -----
AT5G66610      -----
AT5G66640      -----
AT5G17890      MEPPAARVTPSIKADCSMSVNIICEETVLMSLVSHLSAALRREGISVSVVDACGLQETKFF 60

AT1G19270      -----
AT4G36860      -----
AT2G39830      -----
AT5G66620      -----
AT5G66630      -----
AT5G66610      -----
AT5G66640      -----
AT5G17890      SIKONQPLTDGARVLVVVISDEVEFYDFWFPFLKVIQGWQNNNGHVVPVIFYGVDSLTV 120

AT1G19270      -----
AT4G36860      -----
AT2G39830      -----
AT5G66620      -----
AT5G66630      -----
AT5G66610      -----
AT5G66640      -----
AT5G17890      YGILSNMVLTDSELVEEIVRDVYGRLYPAERVGIYARLLETEKLLYKQMRDIRSIGINGM 180

AT1G19270      -----
AT4G36860      -----
AT2G39830      -----
AT5G66620      -----
AT5G66630      -----
AT5G66610      -----
AT5G66640      -----
AT5G17890      PGIGXTTLAKAVFNHMSDYDASCFIENFDEAFHKEGLHALLKERIGKILEDEFDIESSY 240

AT1G19270      -----
AT4G36860      -----
AT2G39830      -----
AT5G66620      -----
AT5G66630      -----
AT5G66610      -----
AT5G66640      -----
AT5G17890      IMRPILHRDLYDKRIILVVIDDVRLSLAAESFLKRLQWFGSGSLIITSVDKOVFAFQCI 300

AT1G19270      -----
AT4G36860      -----
AT2G39830      -----
AT5G66620      -----
AT5G66630      -----
AT5G66610      -----
AT5G66640      -----
AT5G17890      NQIVTVQGLNVHEALQLFSOSVFGINEPEQNDARKLSMKVIDYVNGNPLALSIIYGRLEMGK 360

AT1G19270      -----
AT4G36860      -----
AT2G39830      -----
AT5G66620      -----
AT5G66630      -----
AT5G66610      -----
AT5G66640      -----
AT5G17890      KSEMETAFFELKHCPPLKIQDVLKNAYSALSSENEKMIVLDIAFFFKQZTVNYVMOLLEES 420

AT1G19270      -----
AT4G36860      -----
AT2G39830      -----

```

AT5G66620 -----
AT5G66630 -----
AT5G66610 -----
AT5G66640 -----
AT5G17090 HYFFRLAIDVLVDKCVLTISSENTVQNNLIQDTQCEIFNGEISTCTRMWEPSSRIIVLEY 400

```

AT1G19270 -----
AT4G36860 -----
AT2G39830 -----
AT5G66620 -----
AT5G66630 -----
AT5G66610 -----
AT5G66640 -----
AT5G17890 5ELEGSGETKAMPXSGLVAEHIEG:FLDTSNVNFQVXHDAPKQENLKLFLXIYNNSCSXYI 540

```

AT1G19270 -----
AT4G38860 -----
AT2G39830 -----
AT5G66620 -----
AT5G66630 -----
AT5G66610 -----
AT3G66640 -----
AT5G17890 SGLNFFPGLESLPYELRLLHWNYPLOSLPQDFDGHVLKLSMPYSQLHKLGTATKDLVM 600

```

AT1G19270      -----
AT4G38860      -----
AT2G39830      -----
AT5G66620      -----
AT5G66630      -----
AT5G66610      -----
AT5G66640      -----
AT5G17890      LKRLILSHSLQLVCCDILTYAQNILILDLQGCFLGRFPDTSLOQLIRVVMLSGCTZIKC 660

```

AT1G19270 -----
 AT4G36860 -----
 AT2G39830 -----
 AT5G66620 -----
 AT5G66630 -----
 AT5G66610 -----
 AT5G66640 -----
 AT5G17890 FSGVPPNIEELHLOGTIRREIPIFNATHPPKVKLDKKKLNLENFSDVEHICLECYNL 720

```

AT1G19270 -----
AT1G36860 -----
AT2G39830 -----
AT5G66620 -----
AT5G66630 -----
AT5G66610 -----
AT5G66640 -----
AT5G17390 ATVTSSNVEHGRVLVCLINKCYCSNLRLGLPDMVSLKLVLYLSCGSELEKIMGFPSNLKRL 740

```

AT1G19270 -----
AT4G36560 -----
AT2G39830 -----
AT5G66620 -----
AT5G66630 -----
AT5G66610 -----
AT5G66640 -----
AT5G17890 YVGGTAIRELPOLPMSLEFLNAHGCKHLKSEINLDFQLPRHFIFSMCYRFSQVIAEFVE 840

AT1G19270	-----	
AT4G36860	-----	
AT2G39930	-----	
AT5G66620	-----HASDYYSSEDEGGGE	15
AT5G66630	-----MPISDVASLVGGGAL	15
AT5G66610	-----MKCLS-----CFKP	9

AT5G66640 -----
 AT5G17890 KGLVASLAAKQZELIKAPEVITICIPMDIRORSSFALQAGRHAHTDLVPHMQXPISGFSH 900

AT1G19270 -----MGWFKIFKGSNQRLRVGMNKHNNHVVYDNYPTASHDDEPSAAD 44
 AT4G36860 -----DDDDDEDEDEEYHRAQ 16
 AT2G39830 -----
 AT5G66620 KVG LIGENRFEAZTIHVIEVSQHEADIOKAKORSLATHEAKLDLATHEALQDLAIQE 75
 AT5G66630 GAPLSEIFKLVIEEAKVKDFKPLSQDLASTMERLVPIFNEIDMMQOGSNRGTSSELKVLI 75
 AT5G66610 STFHD2SIEDRFEETNIIVTGISLYEDVILRORR-----SEADQIEWAIQD 54
 AT5G66640 -----
 AT5G17890 SVVVSFQDDYHNDVSLRIRCVGITKTNMOPDAIVERFFQCHAPTEAPKVVADHIFVLYD 960

AT1G19270 TDAENDEPHHTQEPSEEDNTS-NDQENED----- 73
 AT4G36860 LELAEFEERVAQAQIEEEKRAEAQLEE----- 46
 AT2G39830 -----NMVPLPPSSLDORSRGARDKEE----- 23
 AT5G66620 FSRQEEERARRTRELENDQAIANVLQHEERERLIN--KMTALEDEDELLARTLEESLK 133
 AT5G66630 ETMRAGEMVHMCRIQWYSIAKKALYTREIKAINQDFLKFCQIILQLIGHRNOLQMRSL 135
 AT5G66610 SFNPQE---TSRCRQREEDQIARGLOYVEETELD---KSVVDEE----- 93
 AT5G66640 -----
 AT5G17890 TKMHPDSEENHISMMAKLVKFEFHTVSGENPLGASCKVTECGVEVITAATGDISVSGI 1020

AT1G19270 -----IDRAIALS 81
 AT4G36860 -----TEKLLAKA 54
 AT2G39830 -----LDRSISLS 31
 AT5G66620 ENNRKRMFEQVKNDEQLALIVQESLNMSEYPIRLCYKSIAPRAFLVDDEQFAKAVKES 193
 AT5G66630 MCMASVSTKADLLSDIGNEFSKLCLVAQPEVTKFWLKRPIAEKMKMLFEDGVTVVVSAA 195
 AT5G66610 -----DQQLSKIIVEES 104
 AT5G66640 -----
 AT5G17890 IRESEITITIEREDITIDEENTPLLSRKPEETNRSSSSZLOKLSSTSSKPKNLSRSRRA 1080

AT1G19270 LLEINQEQTSISGKYSMPVDEDEQLARALQES----- 113
 AT4G36860 RLLEEMRRSK-----AOLEEDELLAKALQES----- 81
 AT2G39830 LADNTRKPHGYG-----WSHNNRDFPRPFHGG----- 59
 AT5G66620 LKNKGKG-----KQFEDEQVKNDEQLALIVQES----- 221
 AT5G66630 PYALGKTLVTKLCHDADYKEKFKQIFFISVSKFPNVRLLIGHKLEHIGCKANEYENDLD 255
 AT5G66610 LKEXGKS-----KQFEDQVENDEQOALMVQES----- 132
 AT5G66640 -----MYRRRQREEDERIEIERVKEES----- 22
 AT5G17890 TTALAEALAEALKEERLEEDTRELQIALIESKY----- 1113

AT1G19270 --MVVGNSPRHKSGSTYINGNAYGAGDLYGNHMY-----G 147
 AT4G36860 --MNVGSPPR----- 69
 AT2G39830 --LNPSSFP----- 47
 AT5G66620 --LNMVESPPRLZENNMISTRAP-----VDEDE----- 247
 AT5G66630 ANLYIQQLKQLGRNGSILLVLDDVWAEES----- 286
 AT5G66610 --LYMVLSAQLEEDENISTIPP-----LNEDA----- 159
 AT5G66640 --LKLAKQAZEXRLEESKEQKRIQVDDO----- 50
 AT5G17890 --IKKIKQADERDQIKHADEREQKHSHKDHFEELISNEKEERRRSHKDYVIEELVLKGGK 1171

AT1G19270 GGNVYANGDIYYFRPII-----FOM 167
 AT4G36860 ----YDPGNILQPYPL-----IPS 105
 AT2G39830 -----PYEPSYQ-----YRR 77
 AT5G66620 QLAFAVEESLKGKGQIK-----QSFDEVEGDGML-----LELNP 281
 AT5G66630 LLQKFLIQLPDYKILUTSFEFTISFGPTFHLKPLIDDEVECRDEIEENEKLP-----EVNP 342
 AT5G66610 QLOKVIWESAKHGQIE-----HFWDFVEZDGNLPRVDLNVNH 196
 AT5G66640 --QLAKTISKDKQEN-----HSEKVVVE-----DVNP 76
 AT5G17890 KKKQLDDDKADEKEQIK-----HSEKDVVE-----EVNP 1200

AT1G19270 DFRICAGCNMEIGHGRFLNCLNSLWHPCEFRCYGCSSOPISEYEFSTSGNYPENKACYRER 227
 AT4G36860 SHRICVGCQAEIGHGRFLSCMGGVWHPCEFCCNACDKPIIDYEFSSMSGNRPYHKLCYKEQ 165
 AT2G39830 RQRICGGCHSDIGSGNYLGCMGTFTHPECFRCHSCGYAITENEFSLSGTPYHKLCYKEL 137
 AT5G66620 PPSLCGGCHFAVEHGGSVNILEVWHPGCFPCRACHWPIAHDIENHVSNSRGEFHKSCY 341
 AT5G66630 PLSMCGGCHSAVKHEESVNLGLVWHPGCFPCRSCDKPIAHIELNHVSNSRGEFHKSCY 402
 AT5G66610 PHSICDGCKSAIEYGRSVHALGVWHPZCFCCRYCDKPIAMH----- 238
 AT5G66640 PPS-SIDGSEIGDGTSVN-----PRCLCCFHCRAPFVWHEILK-KGFHIDCYKEYY 127
 AT5G17890 PLSKCKDCKSAIEDGISINAYGSVWHPQCFCLRCREPIAMNITISDLRGVWHPCYKELR 1260

AT1G19270	NDGRKLCLECLDSAVMDTMQCCPLYLQIQNFYEGLNMKVEQEVPLLLVERQALNEAREGE	347
AT4G36860	DDGRKLCLECLDSAIMDTHECQPLYLEIRFEYEGLHMKVEQIQIMLLVERSAALNEAVEGE	285
AT2G39830	EDGRSLCLECMETAITDTGECQPLYHAIRDYEGMYMKLQOIIMLLVQREALNDAMVEGE	257
AT5G66620	ADGRWLCLECMNSAVMDSDECQPLKFDYEGFLNMKIEKEFFPLLVEKQALNKAKEE	454
AT5G66630	SDGRWLCLECGFS-AMDSDECQPLYFDMRDFTESLNMKIEKEFFPLILVRKELLNKKEE--E	512
AT5G66640	ADNFWLCVCKMECAVMDTNEVCQPLHFEIRFEFGSLNMKVEKEFPLLLVKREALKAKAEQE	338
AT5G66610	GDFRWLCIECMGSAVMDTNEVCQPLHFEIRFEFGSLNKKVDKEFALLLVKQALNKAEEZE	247
AT5G17890	ADDFWLCRECMGSAIMDSDECQPLHFEIRFEFGSLHMKIEKEFFPVYLVEKNALNKAKEE	1378

AT1G19270	KNGHYHMPETRGCLCLSEEQTVSTVFKPSKH-GTG-KWAGNITEPYKLTFQCEVTAAILILF	405
AT4G36860	KNGHHMLPETRGCLCLSEEQTVTTVLRRPRI-GAGYKLIDMITPCRLIKRCEVTAAILILY	344
AT2G39830	KNGYHHPMETRGCLCLSEEQTVTSVLRRPRL-GAH-PLVGMHTQPPRLTRKCEVTAAILVLY	315
AT5G66620	KIDYQYEVVTRGICLSESQIVDSVSRPVR-GPNKLVGMTBESQKVTRECEVTAAILLY	513
AT5G66630	KIDNHYEVLIFAYCMSQKIMTVVSELPRT-GGNKQLIDMITPQGVVHECKVTAAILLY	571
AT5G66610	KIDNQHGVTTRGICLSEGGIVNSVFKKPTM-GPNCGLVSLGTPSQKVVHECEVTAAILLY	397
AT5G66640	KIDYHRAAVTRGLCMSSEQIVFSIIKGRPMGPDMLITDIVTESQRVS-GFEVTGILIIY	306
AT5G17890	KIGDQCLMVVRGICLSEEQIVTSVSGVVR-MLNEQILDTVTESQRVVPKCEVTAAILLY	1437

AT1G19270	GLPRLTGSILAHEMMHAMMRKGFRTLSQDVEEGICQVMAHKWLDALAGSTNSNLAAS	465
AT4G36860	GLPRLTGSILAHEMMHAWLRNGYPNLRFEEGGICQVLAHMWLESETYAGSTLVDIAS	404
AT2G39830	GLPRLTGAILAHELNMHCWLPLNGFRNLNPVEEKGICQVLYSMWLESEVLSDPTPNLPS	375
AT5G66620	GLPRLLTGYILAHEMMHAYLPNLGNHRNNLNILEGICQVLGHMLWLDSEQTYATADATADAS	573
AT5G66620	GLPRLTTGYILAHEMMHAWLPLNGHMMNLNILEGICQVLGHMLWLESCQTYATADTTADAA	631
AT5G66610	GLPFLTTGYILAHEMMHAWLRNGYNRNLRLSLEGGICQVLGHMWLESQTYS---SSAAA	453
AT5G66640	GLPRLTTGYILAHEMMHAWLRLNGYNRLRLLEEGLCQALGLRWLESQTFASTDAAAAAA	366
AT5G17890	GLPRLTTGYILAHEMMHAYLPNLGNRLNMVLESGLCQVLGYMWLECCTYVFD---TAT	1493
	***** ***** **:* * :*:***: **:	

AT1G19270	SSSS-----SQGLKKGPR-SQYERKLGEFFKHQIESDASPVYGGDFRAGRLAVH	513
AT4G36660	SSSSA-----VV---SASSRKEG-RSDFEKKLGEFFKHQIESDSSAYGGDFRQGNQAVL	453
AT2G39830	TSVVA-----TSSSSSF9NKKGG-KSNVEKKLGEFFKHQIAMDASPAYGGGFRAANAAAC	429
AT5G66620	SSASS---SSRTPPAASAKKGE-WSDFEKKLVEFCNKQIETDSDSPVYGLGFTVTNMEVT	629
AT5G66630	SSASS---SSRTPPAASAKKGE-WSDFEKKLVEFCNKQIETDSDSPVYGLGFTVTNMEVT	687
AT5G66610	SSASS---SSRTP-AANASKEGA-QSDYERKKLVEFCNKQIETDSDSPVYGVGFKEVNVHVS	508
AT5G66640	VASSSSFSSTTAPPAATSKKSDWSIFEKKLVEFCNKQIETDSDSPVYGLGFTQVYEMMV	426
AT5G17890	IASSS---SSSRTPLTSTTSKKVD-PSDFEKKLNVNFKKHQIETDSDSFEGDGF9KVNKMA	1550

AT1G19270	KY--GLRKTLEHIQMTGRFPV----	532
AT4G36860	KH--GLRRTLDHIRLTGTGFPKW--	476
AT2G39830	KY--GLRRTLDHIRLTGTGFP--	448
AT5G66620	NS--SLQETLKEILPQR-----	644
AT5G66630	NS--SLQETLKEILRR-----	702
AT5G66610	DS--SLHKILKSIQHWTKFDPDNL--	529
AT5G66640	SNNYNIKDTLKDIVSASNATPDSV	451
AT5G17890	SNNHSLKDTLKEILISIKTPQYSKL	1575

[illegible]

	1401	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
AIDAL1.pro (218)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
AIDAR1.pro (227)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
AIDAR2.pro (208)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
AIDAR3.pro (116)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
AIDAR4.pro (1285)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
AIDAR5.pro (396)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
AIDAR6.pro (335)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
AIDAR7.pro (246)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
BIDA1a.pro (218)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
BIDA1b.pro (201)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
BIDA1c.pro (269)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
BIDA2.pro (193)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
BIDA3-7.pro (192)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
BIDA11.pro (196)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
BIDA12.pro (186)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
BIDA13.pro (187)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
OSDAL1.pro (178)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
OSDAL2.pro (179)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
OSDAL3.pro (197)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
OSDAL4.pro (823)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
PPDAL1.pro (78)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
PPDAL2.pro (62)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
PPDAL3.pro (169)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
PPDAL4.pro (1)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
PPDAL5.pro (103)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
PPDAL5.pro (68)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
PPDAL7.pro (63)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
PPDAL8.pro (119)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
SmDAL1.pro (178)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
SmDAL2.pro (141)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
	1501	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
AIDA1.pro (289)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
AIDA1.pro (298)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
AIDA2.pro (279)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
AIDA3.pro (188)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
AIDA4.pro (1355)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
AIDAR5.pro (457)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
AIDAR6.pro (396)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
AIDAR7.pro (311)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
BIDA1a.pro (289)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
BIDA1b.pro (272)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
BIDA1c.pro (340)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
BIDA2.pro (264)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
BIDA3-7.pro (262)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
BIDA11.pro (267)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
BIDA12.pro (278)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
BIDA13.pro (258)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
OSDAL1.pro (241)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
OSDAL2.pro (250)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
OSDAL3.pro (268)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
OSDAL4.pro (894)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
PPDAL1.pro (168)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
PPDAL2.pro (133)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
PPDAL3.pro (231)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
PPDAL4.pro (1)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
PPDAL6.pro (174)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
PPDAL5.pro (139)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
PPDAL7.pro (134)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
PPDAL8.pro (190)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
SmDAL1.pro (246)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---
SmDAL2.pro (223)	PNHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	MAHAGTGLR	NRKGVGSHH	---	---	---	---	---

	1601	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700
AlDA1.pro (378)	GTGKAG	NHGRH	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
AlDA1.pro (387)	GAGYH	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
AlDA2.pro (367)	LGAKH	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
AlDA3.pro (277)	GPKH	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
AlDA4.pro (1447)	MLAKH	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
AlDA5.pro (543)	GQKQ	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
AlDA6.pro (485)	GPKH	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
AlDA7.pro (400)	GPKH	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
BrDA1a.pro (378)	GTGKAG	NHGRH	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
BrDA1b.pro (359)	KQKQ	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
BrDA1c.pro (429)	GAGYH	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
BrDA2.pro (352)	LGAKH	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
BrDA3-7.pro (351)	GAGYH	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
BdDAL1.pro (355)	KQKQ	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
BdDAL2.pro (364)	KQKQ	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
BdDAL3.pro (346)	IQKQ	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
OsDA1.pro (329)	KQKQ	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
OsDA2.pro (338)	IQKQ	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
OsDA3.pro (356)	GPKH	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
OsDA4.pro (362)	GPKH	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
PpDAL1.pro (247)	KQKQ	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
PpDAL2.pro (219)	SFPK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
PpDAL3.pro (319)	VFSK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
PpDAL4.pro (80)	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
PpDAL5.pro (262)	DEYK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
PpDAL6.pro (234)	SFPK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
PpDAL7.pro (220)	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
PpDAL8.pro (278)	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
SmDAL1.pro (336)	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
SmDAL2.pro (305)	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK

	1701	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780
AlDA1.pro (471)	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
AlDA1.pro (480)	AVV	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
AlDA2.pro (462)	S--SSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
AlDA3.pro (372)	SSSTAPPAAITK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
AlDA4.pro (1539)	SRPLSTTIS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
AlDA5.pro (638)	S--RTPPAASAS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
AlDA6.pro (579)	SSSTPPAASAS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
AlDA7.pro (493)	TPAANAS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
BrDA1a.pro (471)	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
BrDA1b.pro (453)	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
BrDA1c.pro (525)	S--AAVA	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
BrDA2.pro (447)	S--SSSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
BrDA3-7.pro (442)	APPAAASTLK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
BdDAL1.pro (449)	S--SSSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
BdDAL2.pro (461)	SSSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
BdDAL3.pro (441)	S--SSSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
OsDA1.pro (423)	S--SSSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
OsDA2.pro (433)	S--SSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
OsDA3.pro (451)	S--SSSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
OsDA4.pro (1077)	S--SSST	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
PpDAL1.pro (337)	S--SSSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
PpDAL2.pro (309)	SSSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
PpDAL3.pro (409)	T--SSSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
PpDAL4.pro (165)	V--SSSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
PpDAL5.pro (349)	V--SSSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
PpDAL6.pro (324)	D--SSSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
PpDAL7.pro (292)	SSSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
PpDAL8.pro (363)	SSSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
SmDAL1.pro (411)	SSSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK
SmDAL2.pro (379)	SSSS	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK	QKQK

Identical

Conservative

Block of similar

REIVINDICAÇÕES

1. Método para aumentar a longevidade, tamanho de órgão e/ou tamanho de semente de uma planta, caracterizado pelo fato de que compreende;

5 expressar um polipeptídeo DA negativo dominante dentro das células da dita planta,

em que o polipeptídeo DA negativo dominante consiste de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 e 301 a 330, com uma mutação R para K em uma posição equivalente à posição 358 da SEQ ID NO: 1.

10 2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende reduzir ou abolir a expressão de um polipeptídeo BB dentro das células da dita planta, em que o polipeptídeo BB consiste de uma sequência de aminoácidos compreendendo a SEQ ID NO: 9.

3. Método para produzir uma planta com longevidade, tamanho de órgão e/ou tamanho de semente aumentados, caracterizado pelo fato de que compreende:

15 (i) produzir uma célula de planta que expresse um polipeptídeo DA negativo dominante consistindo de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 e 301 a 330 com uma mutação R para K em uma posição equivalente à posição
20 358 da SEQ ID NO: 1, e

(ii) regenerar a planta a partir de uma ou mais células transformadas.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente incorporar um ácido nucleico heterólogo que expresse um ácido nucleico supressor que reduza a expressão
25 de um polipeptídeo BB consistindo da SEQ ID NO: 9 dentro da dita célula de planta por meios de transformação, em que o ácido nucleico supressor é um dsRNA, siRNA, shRNA, miRNA ou um ácido nucleico anti-sentido.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de

1 a 4, caracterizado pelo fato de que compreende propagar sexual ou assexualmente ou cultivar a progênie ou os descendentes da planta que expressam a forma negativa dominante de um polipeptídeo DA.

5 6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a planta é uma planta superior.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a planta é uma planta agrícola selecionada do grupo que consiste de *Lithospermum erythrorhizon*, *Taxus spp*, tabaco, curcúbitas, cenoura, brássica de planta, melões, pimenta de caiena, videiras, alface, morango, 10 brássica de semente oleaginosa, beterraba açucareira, trigo, cevada, milho, arroz, sojas, ervilhas, sorgo, girassol, tomate, batata, pimentão, crisântemo, cravo, linhaça, cânhamo e centeio.

8. Método para prolongar o período de crescimento em uma planta, caracterizado pelo fato de que compreende expressar dentro de uma 15 planta uma variante de DA1 ou DAR, em que a variante de DA1 ou DAR consiste de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 e 301 a 330, com uma mutação R para K em uma posição equivalente à posição 358 da SEQ ID NO: 1.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente uma ou mais mutações que rompem 20 as funções de EOD1 (SEQ ID NO: 9), em que as ditas mutações interferem com a limitação da duração do crescimento proliferativo e aumentam o tamanho de semente e ou órgão.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que compreende introduzir um ou mais transgenes que expressam 25 construção(ões) de RNA de interferência que reduz(em) a expressão de EOD1 (SEQ ID NO: 9), em que os ditos transgenes interferem com a limitação da duração do crescimento proliferativo e aumentam o tamanho de semente e ou órgão.



Fig. 1A



Fig. 1B



Fig. 1C



Fig. 1D



Fig. 1E



Fig. 1F

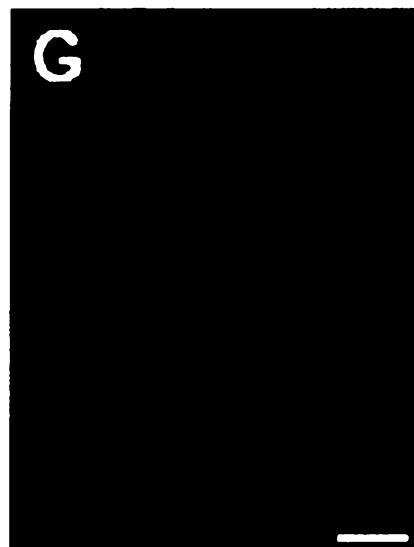


Fig. 1G

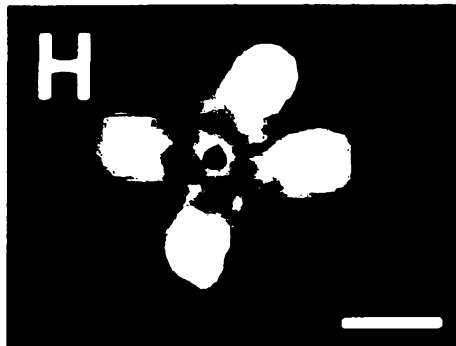


Fig. 1H



Fig. 1I



Fig. 1J



Fig. 1K

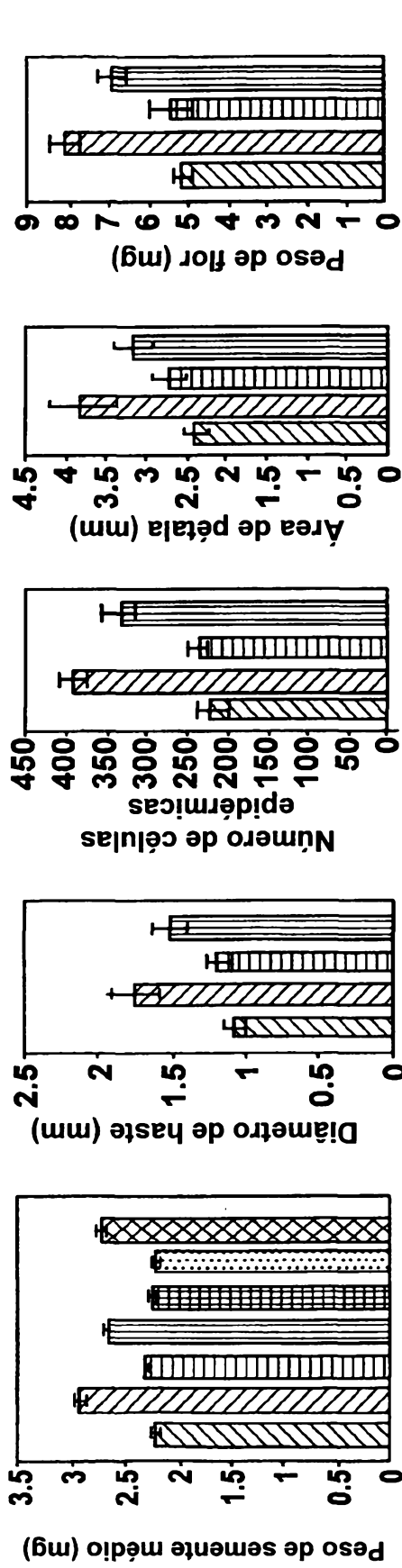


Fig. 1L

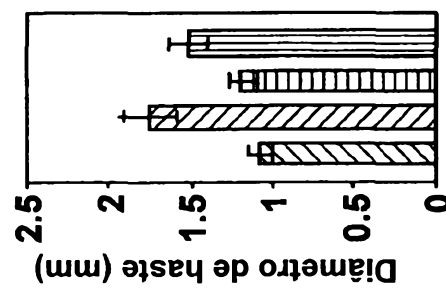


Fig. 1M

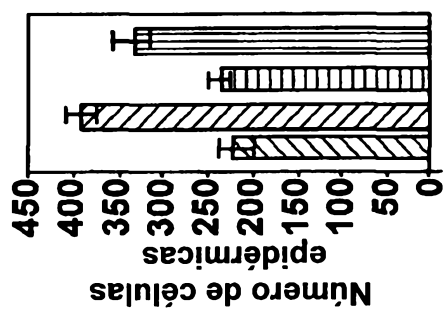


Fig. 1N

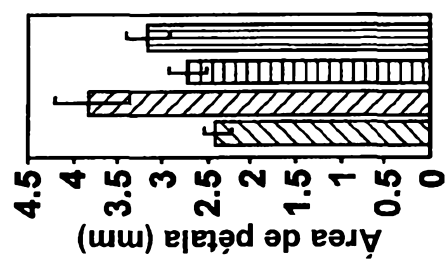


Fig. 1O

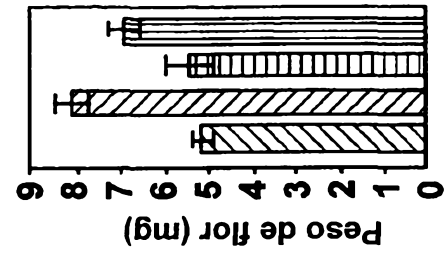


Fig. 1P

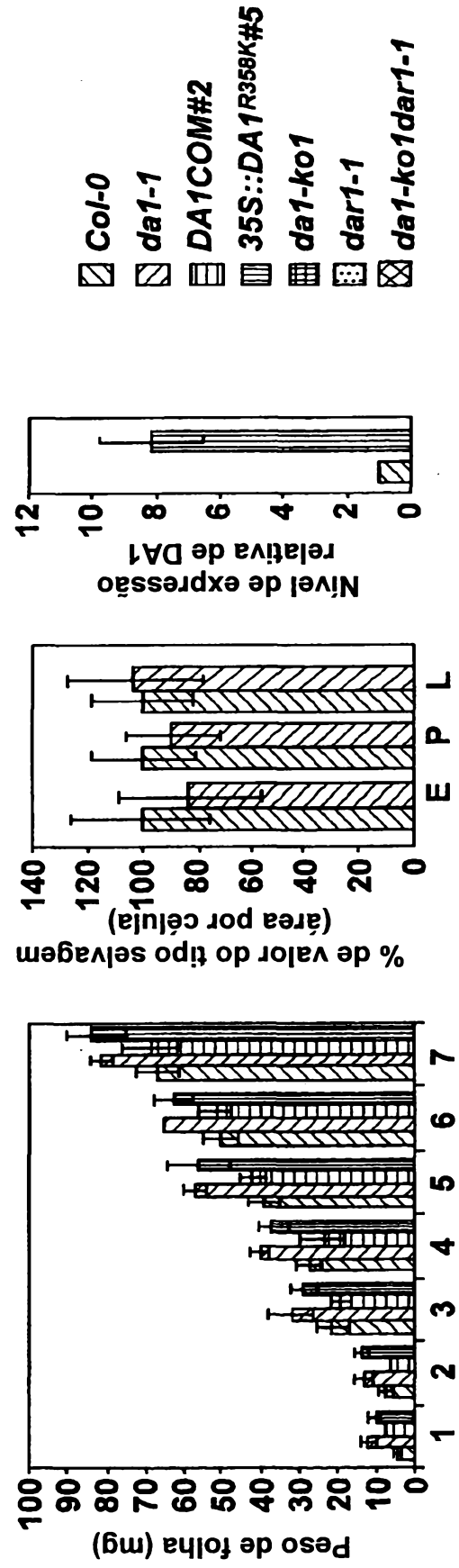


Fig. 1Q

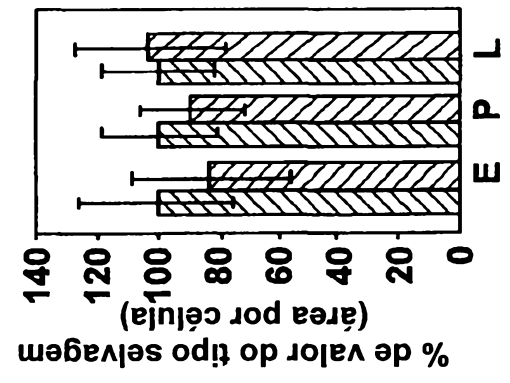


Fig. 1R

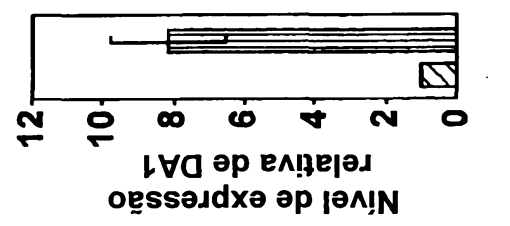


Fig. 1S

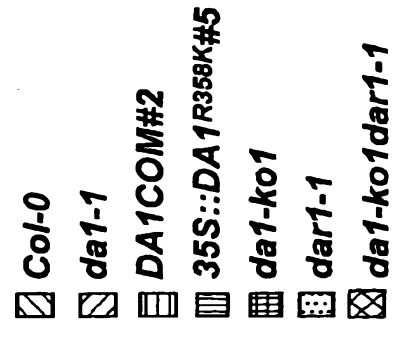


Fig. 1T

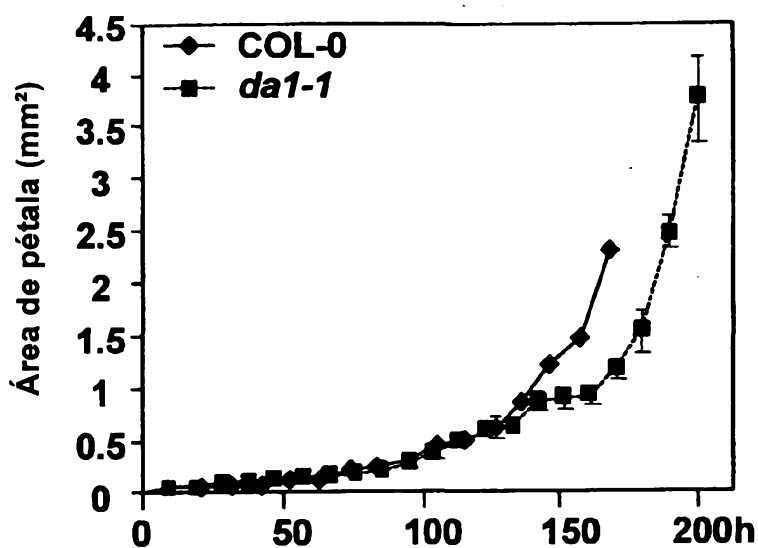


Fig. 2A

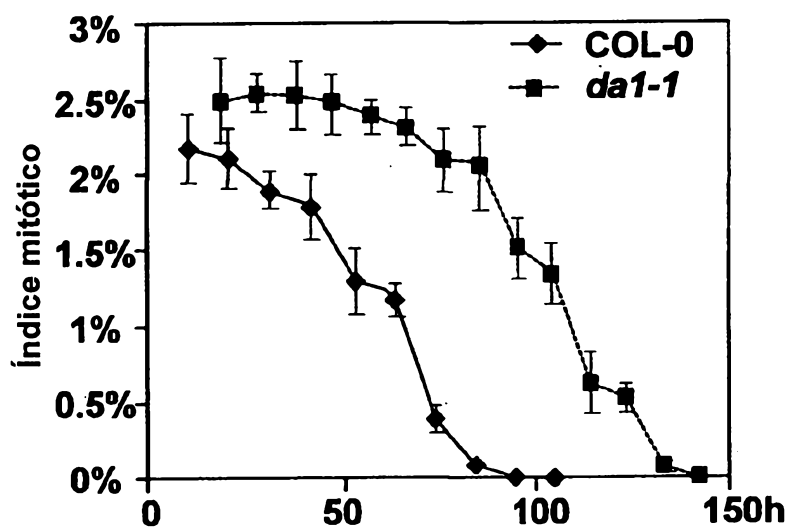


Fig. 2B

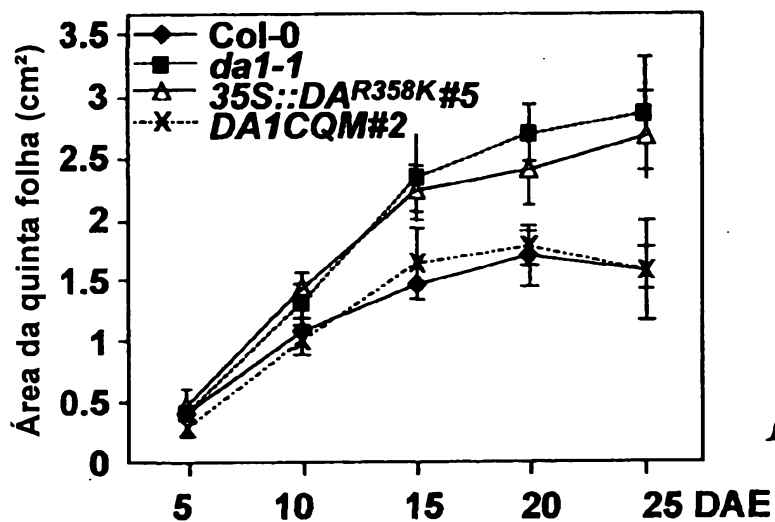


Fig. 2C

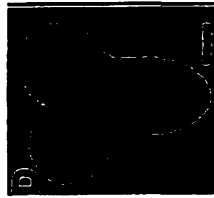
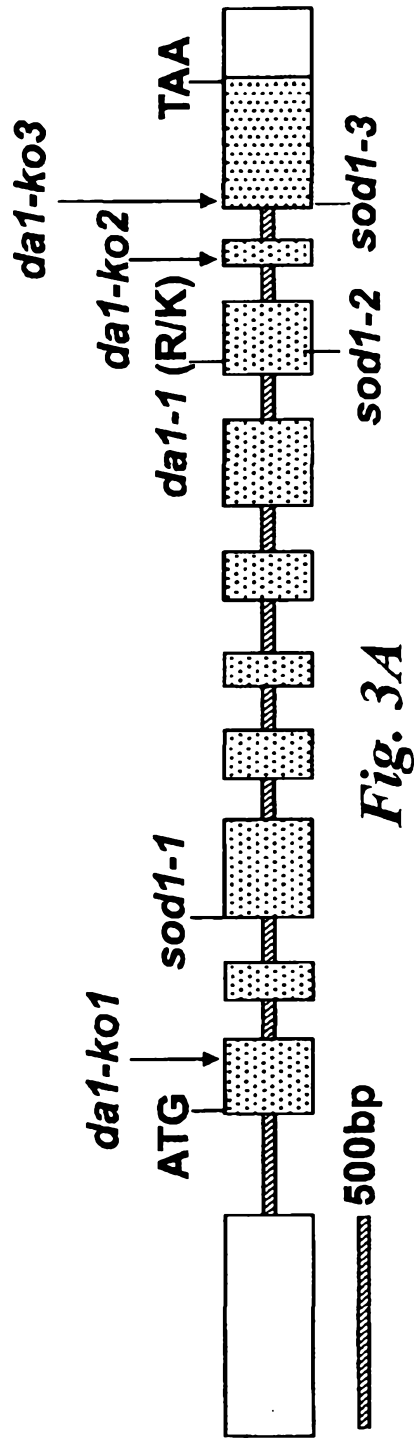


Fig. 3B

Fig. 3C

Fig. 3D



Fig. 3E

Fig. 3F

Fig. 3G

Fig. 3H

Fig. 3I

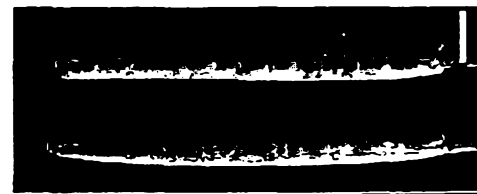


Fig. 3J

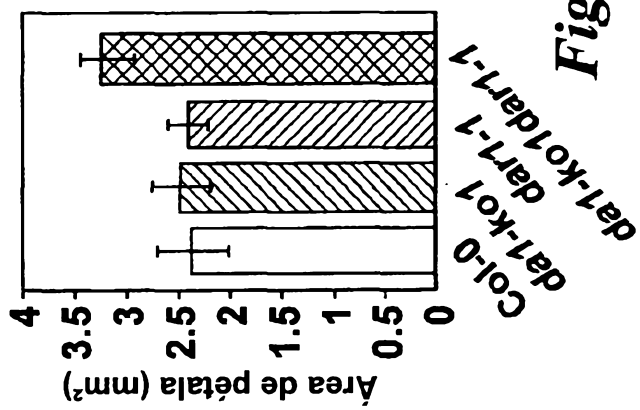


Fig. 3K

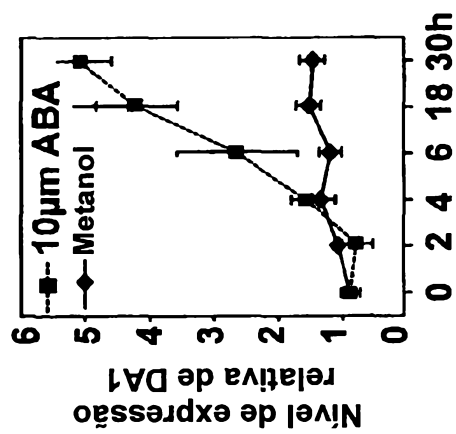


Fig. 3L



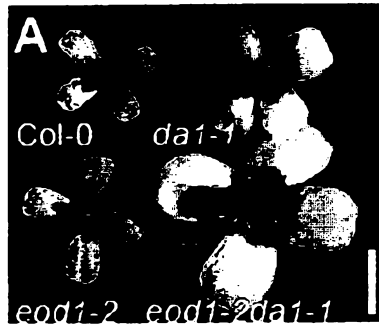
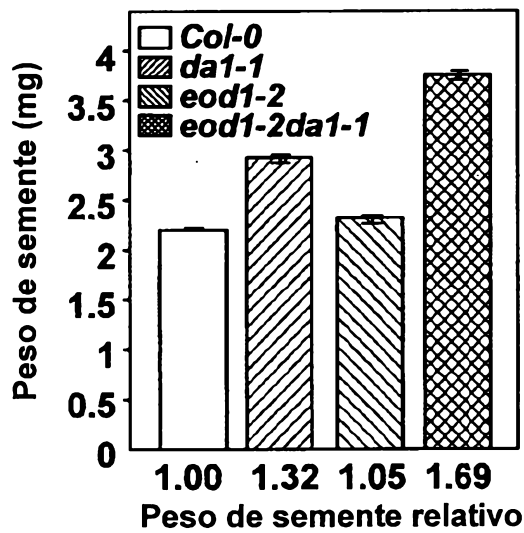
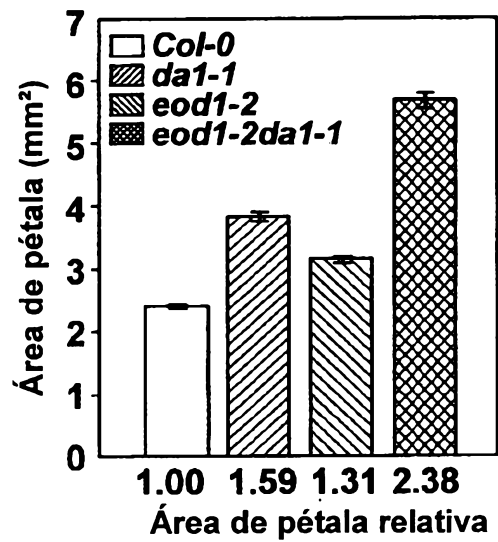
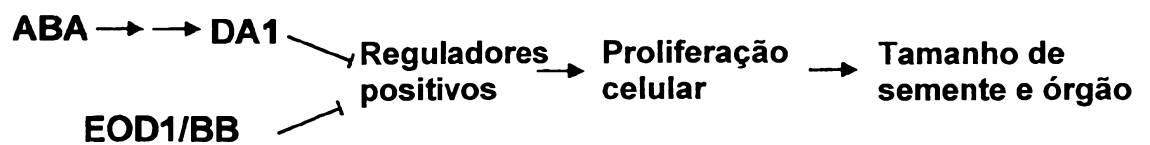
Fig. 3M



Fig. 3N



Fig. 3O

*Fig. 4A**Fig. 4B**Fig. 4C**Fig. 4D**Fig. 4E*

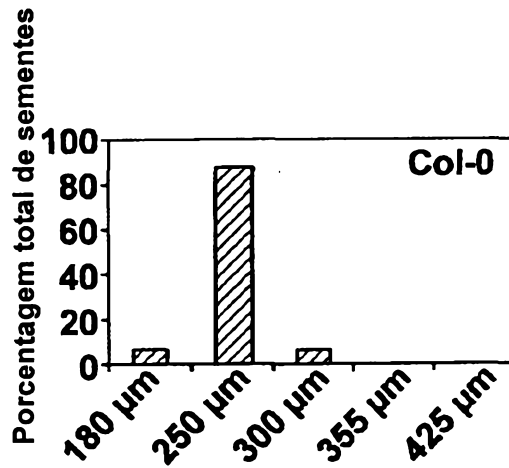
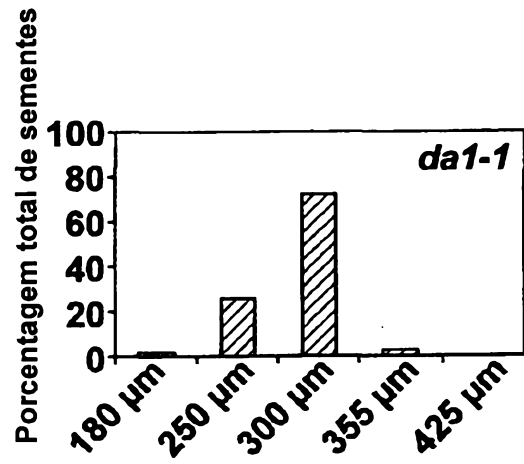
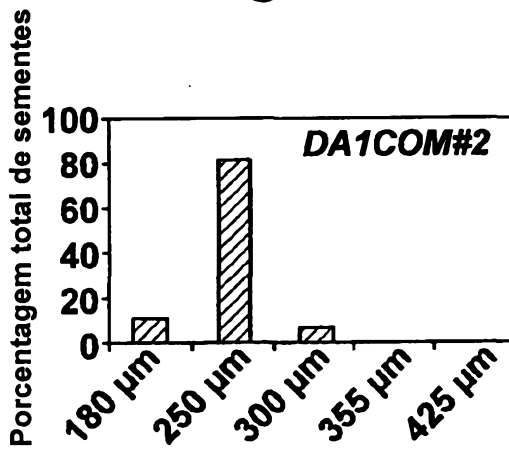
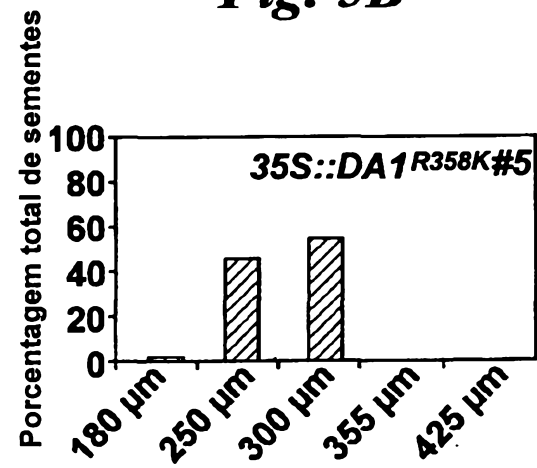
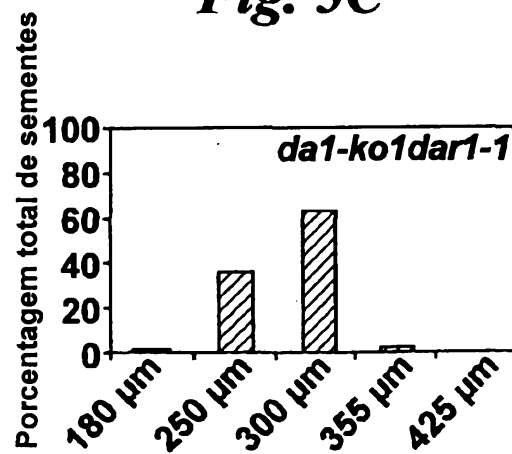
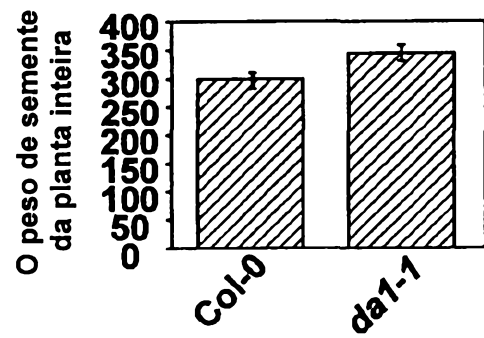
*Fig. 5A**Fig. 5B**Fig. 5C**Fig. 5D**Fig. 5E**Fig. 5F*



Fig. 6A



Fig. 6B



Fig. 6C



Fig. 6D



Fig. 6E



Fig. 6F



Fig. 6G



Fig. 6H

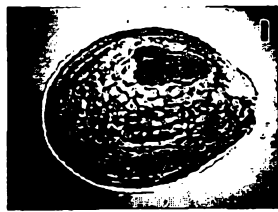


Fig. 6I

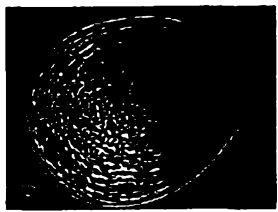


Fig. 6J



Fig. 6K



Fig. 6L

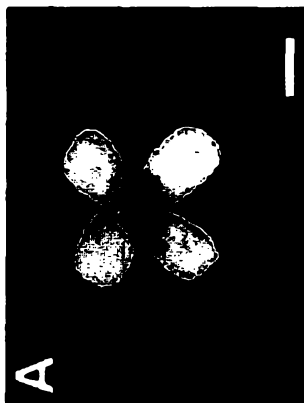


Fig. 7A



Fig. 7B



Fig. 7C



Fig. 7D



Fig. 7E



Fig. 7F



Fig. 7G



Fig. 8A



Fig. 8B

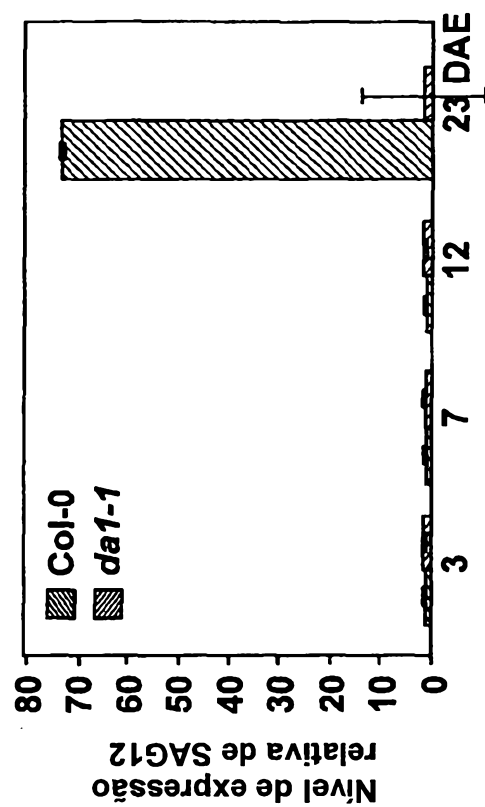


Fig. 8C

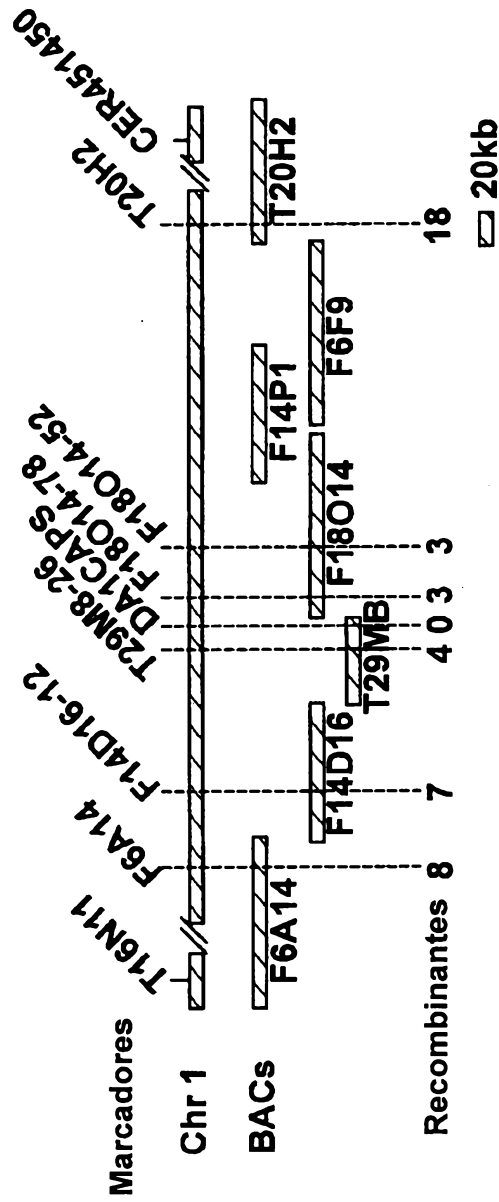


Fig. 9A



Fig. 9B

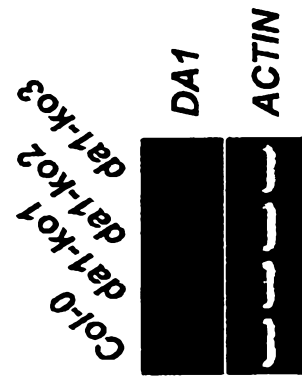


Fig. 9C

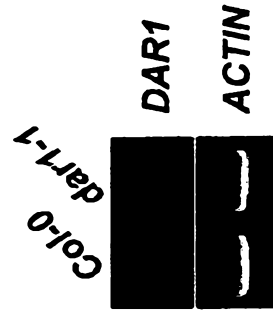
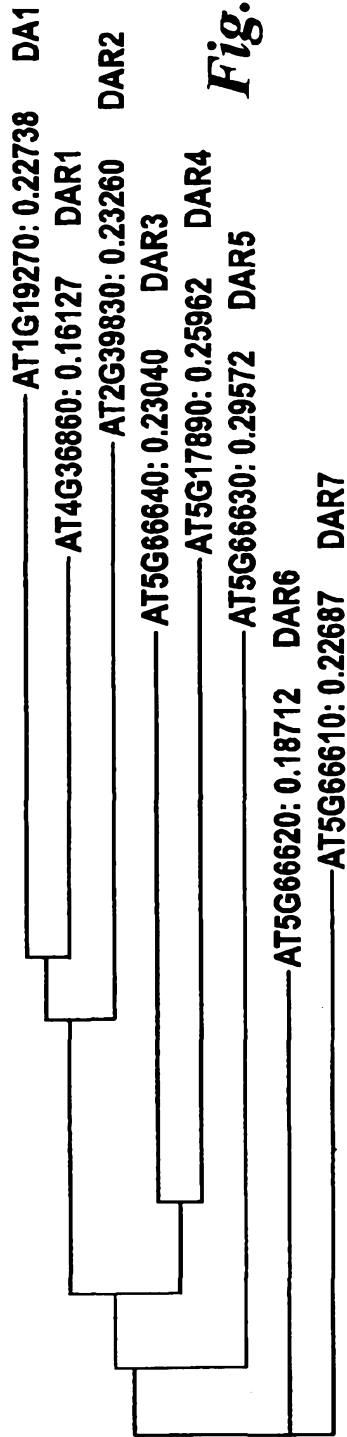
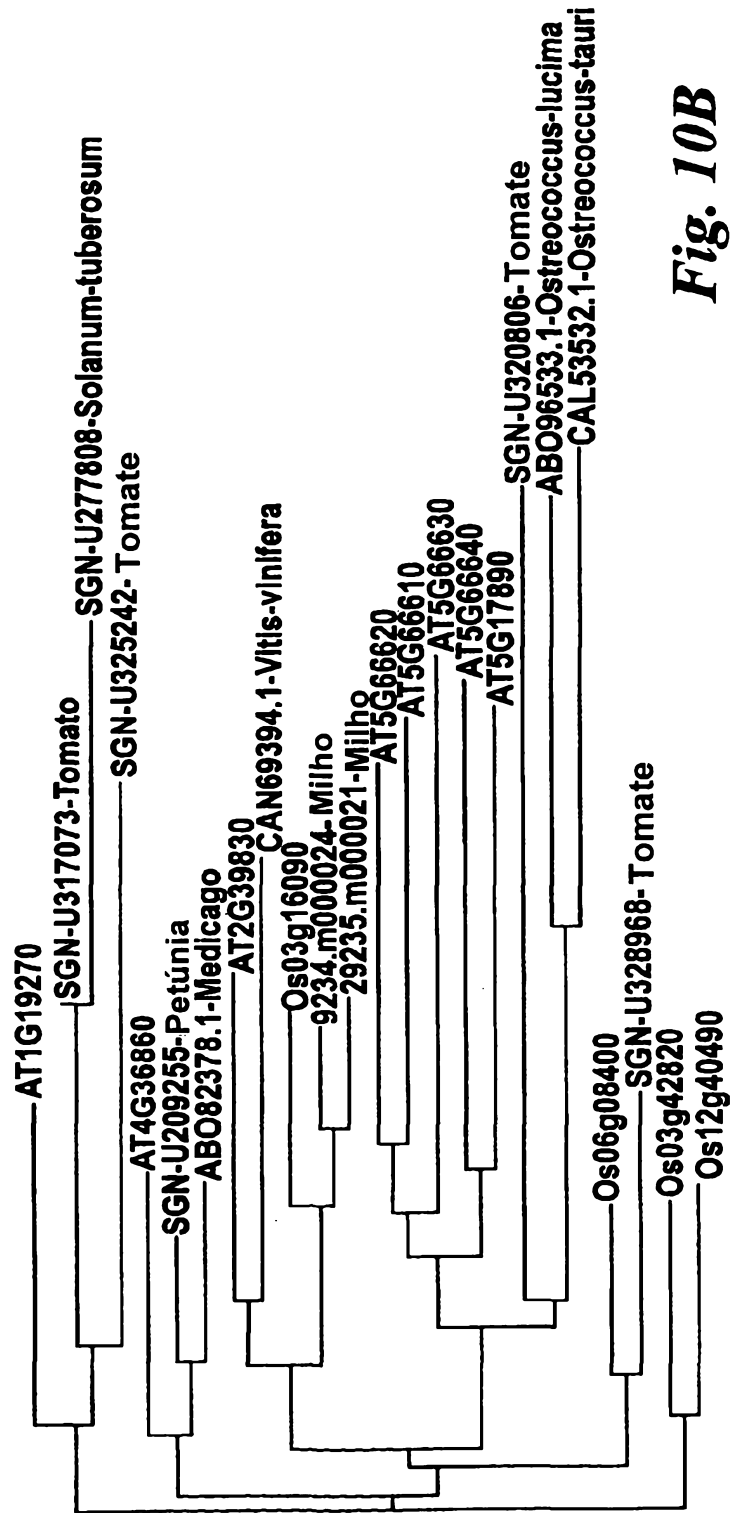


Fig. 9D

*Fig. 10A**Fig. 10B*

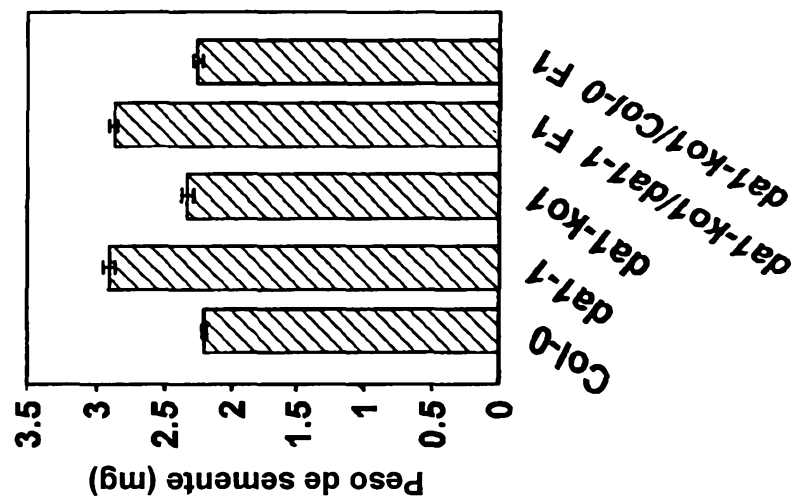


Fig. 11B

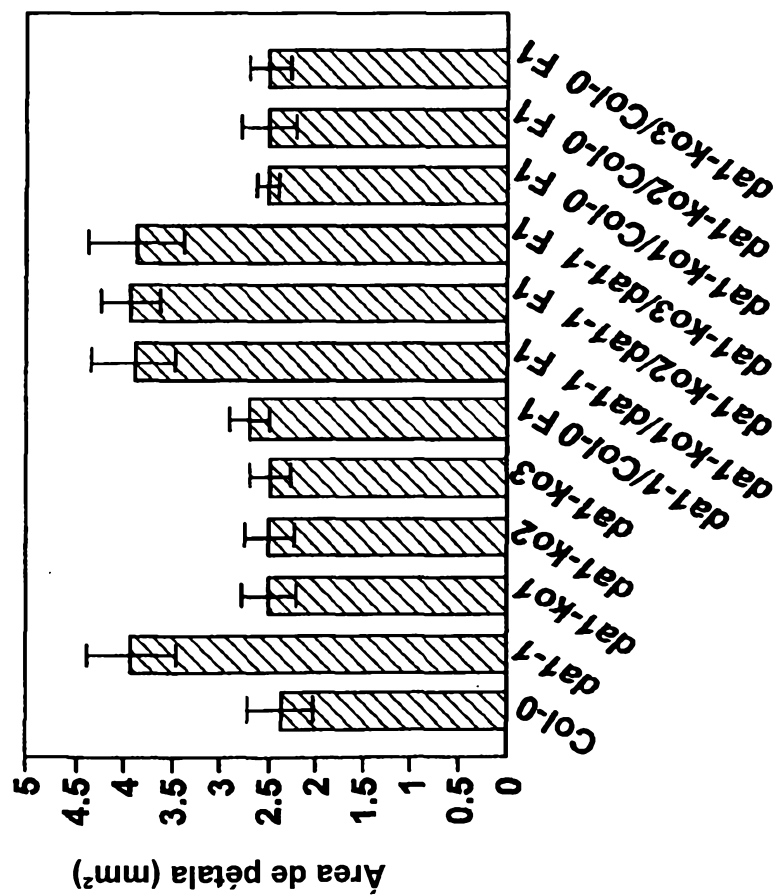
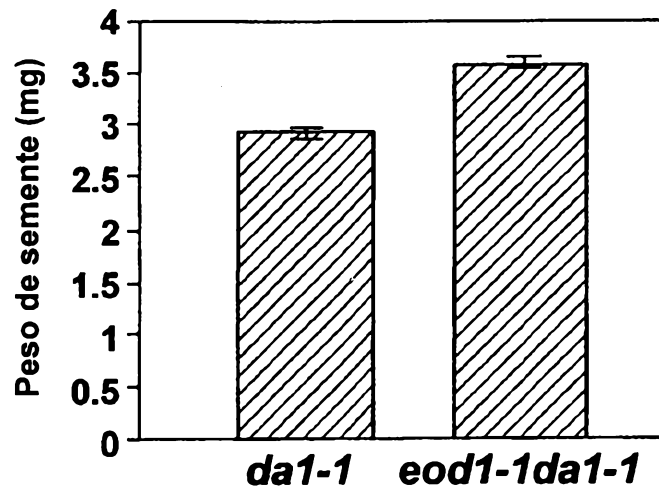
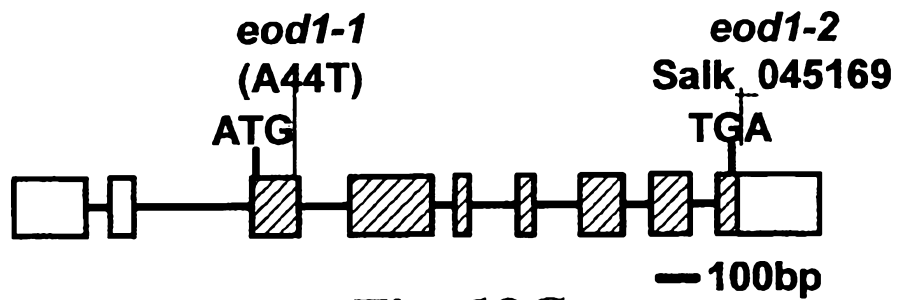
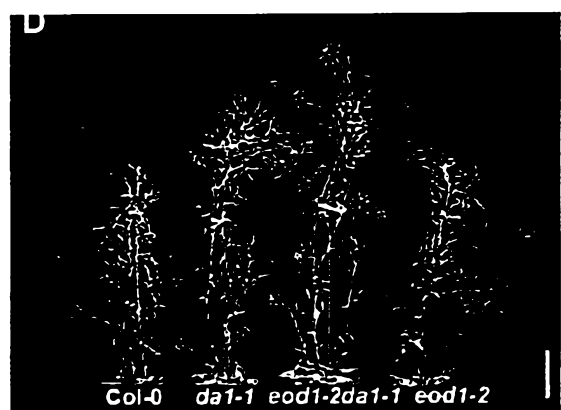
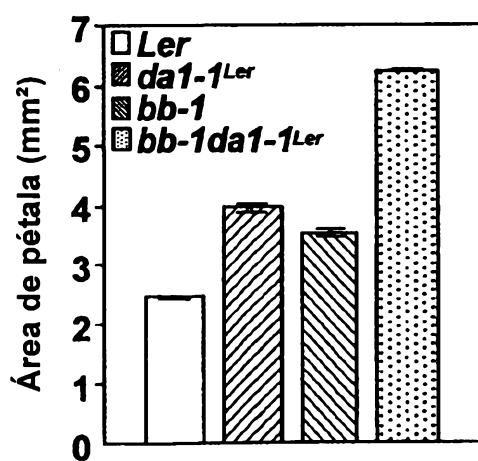


Fig. 11A

*Fig. 12A**Fig. 12B**Fig. 12C*

*Fig. 12D**Fig. 12E**Fig. 12F*

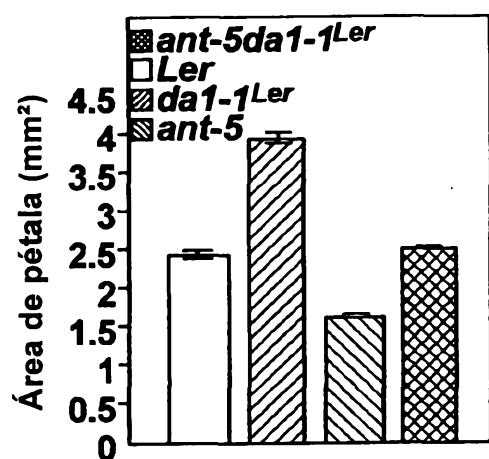


Fig. 13A

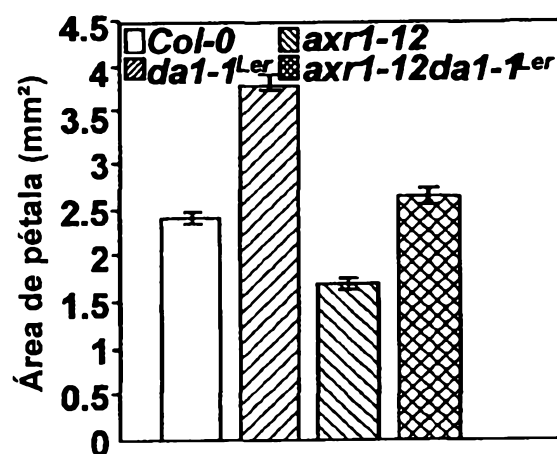


Fig. 13B

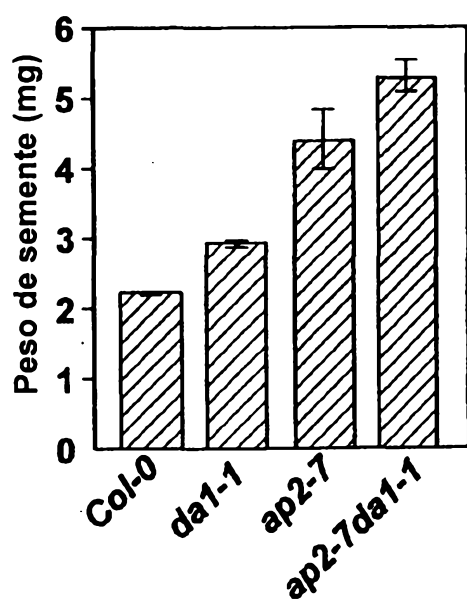


Fig. 13C

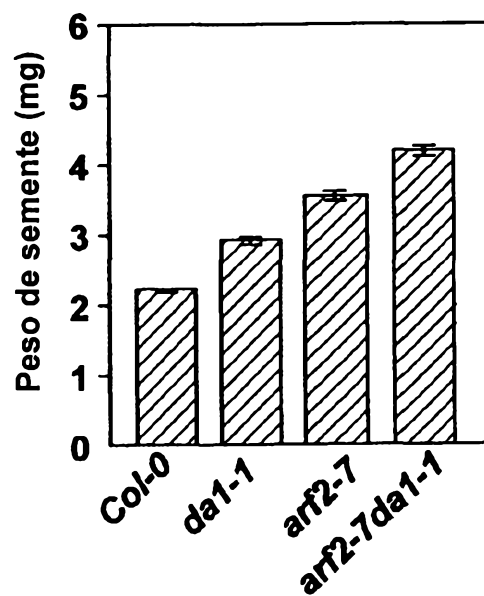


Fig. 13D

Briópsidas

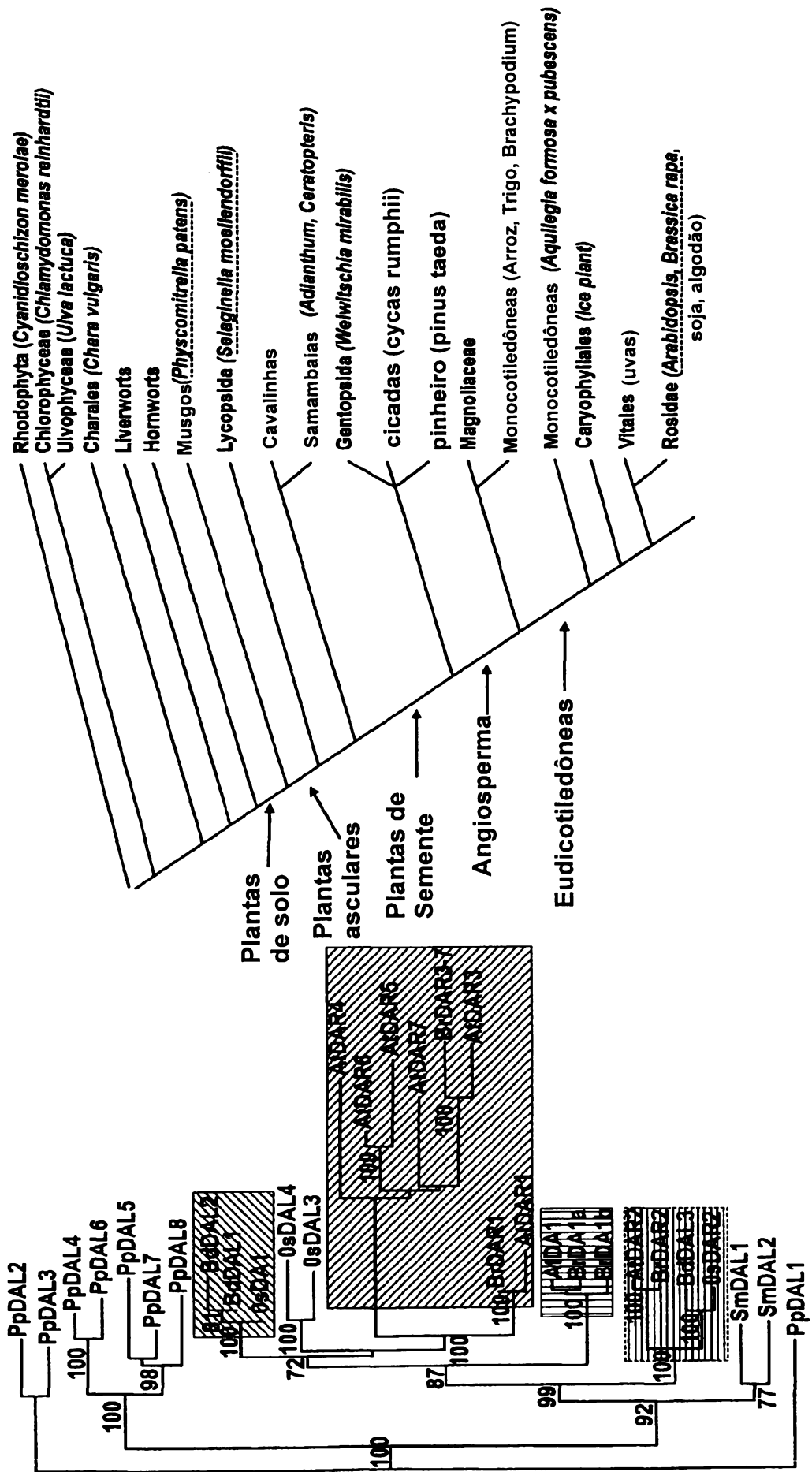


Fig. 14



Fig. 15A

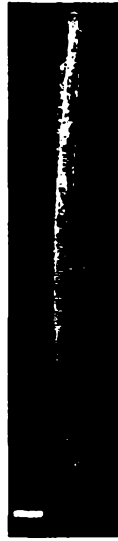


Fig. 15B

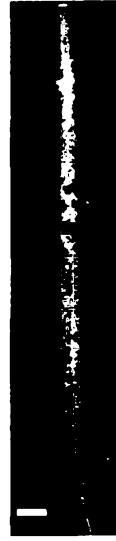


Fig. 15C



Fig. 15D



Fig. 15E

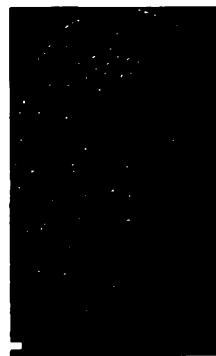


Fig. 15F



Fig. 15G



Fig. 15H

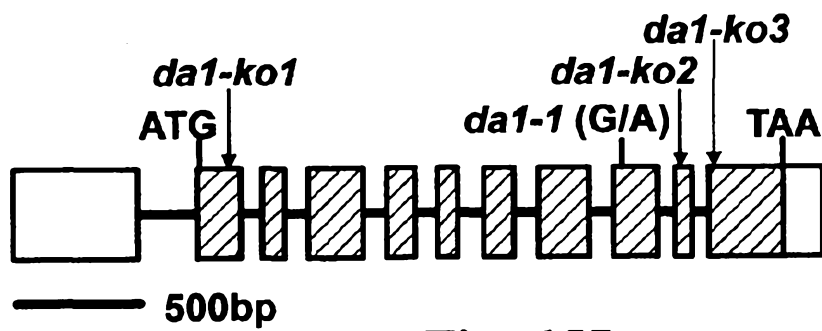


Fig. 15I