



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

(21) PI 0807350-3 A2



(22) Data de Depósito: 05/02/2008
(43) Data da Publicação: 06/05/2014
(RPI 2261)

(51) *Int.Cl.*:
A01H 1/00
C07K 14/415
C12N 15/82
A01H 5/00
C12N 15/29

(54) Título: RECEPTOR DE QUITOCINA PUTATIVA E **(57) Resumo:**
MÉTODOS PARA USO DO MESMO

(30) Prioridade Unionista: 05/02/2007 US 60/888136

(66) Prioridade Interna: 860446

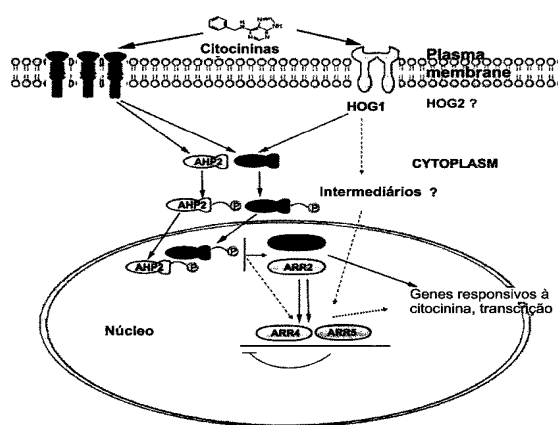
(73) Titular(es): National University Of Singapore

(72) Inventor(es): Mandar Radhakisan Godge, Prakash
Pallathadka Kumar

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

(86) Pedido Internacional: PCT SG2008000039 de
05/02/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/097197 de
14/08/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"RECEPTOR DE QUITOCINA PUTATIVA E MÉTODOS PARA USO DO MESMO"**.

Campo Técnico

A presente invenção refere-se à modulação da expressão de características em plantas, tais como altura da planta, biomassa da planta, desenvolvimento de botão apical, ramificação, fertilidade, florescimento, área da folha, senescência, germinação de semente, produção de semente, peso de semente, desenvolvimento de tronco, produção de grão, número de cultivos, desenvolvimento de meristema floral e desenvolvimento de raiz. A presente invenção também refere-se a métodos e materiais para a modulação da expressão das características em plantas.

Antecedentes

Técnicas de reprodução de planta tradicionais são conhecidas por resultarem em melhoras em colheitas agrícolas. Estas técnicas tais como reprodução e hibridização seletiva envolvem o cruzamento de genes derivados de plantas com diferentes bases genéticas para gerar progênie de várias características. A progênie é selecionada para obter as plantas que expressam as características desejadas e as características deletérias são eliminadas por meio de múltiplos cruzamentos ou autofecundações para eventualmente produzir progênie com as características desejadas. Embora métodos de reprodução tradicionais tenham provado serem úteis no realce ou melhora das características de várias colheitas, estes métodos envolvem o cruzamento de centenas ou milhares de genes em que apenas alguns genes são selecionados quanto às suas características ou traços melhorados. Além disso, estes métodos demoram muitos anos de cruzamento, seleção de várias linhagens de uma grande população de progênie e cruzamento reversível das mesmas para diversas gerações para obter o traço característico. Algumas características indesejáveis podem também ser manifestadas nas plantas por que é geralmente difícil selecionar um traço sem afetar outros usando métodos de reprodução tradicionais.

Outra desvantagem na seleção de planta tradicional é que a reprodução é restrita às plantas que são sexualmente compatíveis, portanto,

métodos de reprodução tradicionais são geralmente limitado pela ausência de diversidade genética no idioplasma de uma espécie particular. Além disso, métodos de reprodução tradicionais tenham provado ser bastante ineficazes para melhorar muitas características poligênicas tais como resistência
5 aumentada à doença.

Embora tenha havido avanços consideráveis em produções de colheita nos últimos anos, neste contexto permanece uma necessidade de obter melhoras significantes em colheitas de alimento maiores para atender à demanda global. Recentes avanços em biotecnologia de planta envolvendo a expressão de transgene individual em colheitas resultaram em uma introdução comercial bem-sucedida de novas características de planta tais como resistência à herbicida, resistência a inseto e resistência a vírus. Entretanto, a lista de características de gene individual de valor significativo é relativamente pequeno e, portanto, expressão de transgene individual em colheitas não é prática para melhora de colheita.
10
15

Nos últimos anos, houve tentativas de isolar certos genes em várias espécies de planta que são conhecidos quimicamente modificar a sequência de DNA na planta de modo que os efeitos em morfologia de planta podem ser caracterizados. um método conhecido envolve o isolamento do gene S-adenosil-L-homocisteine hidrolase (SAHH), uma enzima-chave que é conhecida por regular a metilação de DNA. Embora certas mudanças morfológicas fossem observadas na planta, nenhuma das características fenotípicas provou ter uma vantagem significativa em melhora da produção de colheita em diferentes plantas. Devido à complexidade da interação entre o gene SAHH e as moléculas a jusante, os mecanismos envolvendo a metilação de DNA e expressão de gene são pouco entendidos e métodos existentes para melhora de colheita são, portanto, limitados.
20
25

Desse modo, existe uma necessidade de fornecer novos métodos que superam, ou pelo menos melhoram, uma ou mais das desvantagens descritas acima. Existe uma necessidade de novos métodos para produzir plantas que têm características que são úteis para melhora da colheita e outros usos comerciais e científicos.
30

Sumário

Os presentes inventores identificaram um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1, que está envolvida na trilha de sinalização de citoquinina em plantas. As citoquininas são fito-hormônios (ou hormônios de planta) que são exercidos em células de planta responsivas para fornecer efeitos bioquímicos e fisiológicos específicos. Fito-hormônios são primeiro reconhecidos por receptores específicos que iniciam a transdução do sinal hormonal para estimular a resposta celular importante em crescimento e desenvolvimento de planta. Enquanto receptores de hormônio são bem-estudados em muitos eucariotas variando de florescimento de planta ao homem, houve uma ausência de um entendimento detalhado de receptores de fito-hormônio. Proteínas de ligação de fito-hormônio foram suspeitas de fornecer candidatos para tais receptores.

Os presentes inventores identificaram um significativo aumento em biomassa da planta e produção de colheita, em ambas as espécies monocotiledôneas e dicotiledôneas, quando a expressão do polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 foi diminuída. Ao contrário, a expressão aumentada do polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1, forneceu florescimento precoce em algumas plantas. Portanto, a expressão do polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 pode ser manipulada para obter as características desejadas que são importantes para melhora de colheita e outros usos comerciais e científicos.

Desse modo, de acordo com um primeiro aspecto da invenção, é fornecido a método de modular a expressão de pelo menos uma característica em uma planta, o método compreendendo a etapa de modulação da expressão de pelo menos um polipeptídeo pela planta, em que o polipeptídeo é selecionado do grupo que consiste em:

- i) um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1;
- ii) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoá-

cido que é selecionada do grupo que consiste em qualquer um ou mais do aminoácido 1 a aminoácido 7, de aminoácido 9 a aminoácido 230, de aminoácido 1 a aminoácido 58, de aminoácido 77 a aminoácido 485, de aminoácido 59 a aminoácido 76, de aminoácido 150 a aminoácido 191, de aminoácido 231 a aminoácido 405, e de aminoácido 406 a aminoácido 438 de SEQ ID NO: 1, ou em posições equivalentes em um homólogo dos mesmos, e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta;

iii) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que é capaz de modular sinalização de quitocina na planta; e

iv) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1, em que a modulação da expressão do polipeptídeo modula a expressão de pelo menos uma característica na planta.

Em uma modalidade, a expressão do polipeptídeo pela planta é modulada introduzindo pelo menos um polinucleotídeo que modula a expressão do polipeptídeo em uma ou mais células da planta.

Em outra modalidade, é fornecido um método como definido acima em que a etapa de modulação da expressão do polipeptídeo compreende reduzir a expressão do polipeptídeo. A etapa de redução da expressão do polipeptídeo pela planta pode compreender introduzir a uma ou mais células da planta um polinucleotídeo que reduz a expressão do polipeptídeo. Em uma modalidade, o polinucleotídeo é selecionado do grupo que consiste em:

i) um polinucleotídeo antissense que compreende a sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15;

ii) um polinucleotídeo antissense que compreende pelo menos 15 resíduos de ácido nucleico contíguos selecionados da sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15;

iii) um polinucleotídeo antissense que compreende pelo menos 15 resíduos de ácido nucleico contíguos de um polinucleotídeo que é com-

plementar a uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1;

5 iv) um polinucleotídeo de interferência de RNA que compreende uma sequência de ácido nucleico compreendendo pelo menos 9 resíduos de ácido nucleico contíguos selecionados da sequência de ácido nucleico que é complementar a um polinucleotídeo consistindo na sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15; e

10 v) um polinucleotídeo antissense que consiste na sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15.

Em uma modalidade, o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 80% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta. Em outra modalidade, o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 85% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta. Em ainda outra modalidade, o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 90% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta. Em ainda uma outra modalidade, o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 95% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta.

Em uma modalidade, é fornecido a método como definido acima em que a etapa de modulação da expressão do polipeptídeo compreende aumentar a expressão do polipeptídeo. A etapa de aumentar a expressão do polipeptídeo pela planta pode compreender introduzir a uma ou mais células da planta um polinucleotídeo que aumenta a expressão do polipeptídeo. Em uma modalidade, o polinucleotídeo é selecionado do grupo que consiste em:

i) um polinucleotídeo que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de SEQ ID NO: 1,

5 ii) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que é selecionada do grupo que consiste em qualquer um ou mais do aminoácido 1 a aminoácido 7, de aminoácido 9 a aminoácido 230, de aminoácido 1 a aminoácido 58, de aminoácido 77 a aminoácido 485, de aminoácido 59 a aminoácido 76, de aminoácido 150 a aminoácido 191, de aminoácido 231 a aminoácido 405, e de aminoácido 406 a aminoácido 438 de SEQ ID NO: 1, ou em posições equivalentes em um
10 homólogo dos mesmos, e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta; e

iii) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:
15 1 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta.

Em certas modalidades, o polipeptídeo codificado pelo polinucleotídeo na parte ii) compreende um domínio de sinalização intracelular. Em certas modalidades, o polipeptídeo codificado pelo polinucleotídeo na parte ii) compreende um domínio de ligação de citoquinina extracelular.

20 Em uma modalidade, a pelo menos uma característica em uma planta é selecionada do grupo que consiste em qualquer uma ou mais de altura da planta, biomassa da planta, desenvolvimento de botão apical, ramificação, fertilidade, florescimento, área da folha, senescência, germinação de semente, produção de semente, peso de semente, desenvolvimento de tronco,
25 co, produção de grão, número de cultivos, desenvolvimento de meristema floral e desenvolvimento de raiz.

Em uma modalidade, a expressão diminuída do polipeptídeo como definido acima induz à mudanças na expressão de características na planta incluindo, porém não limitadas a qualquer uma ou mais de ramificação aumentada, produção de semente aumentada, biomassa da planta aumentada, produção de grão aumentada, número de cultivos aumentado, área da folha aumentada, germinação de semente retardada, predominância
30

apical diminuída, e florescimento retardado, ou combinações dos mesmos na planta quando comparado a uma planta do mesmo tipo em que a expressão do polipeptídeo não foi modulada.

Em outra modalidade, o aumento em expressão do polipeptídeo modula pelo menos uma característica selecionada do grupo que consiste em qualquer uma ou mais de florescimento precoce, nanismo, número diminuído de folhas, senescência precoce, germinação de semente precoce, formação retardada e reduzida de folhas de roseta, crescimento de raiz de muda aumentado, ou combinações dos mesmos na planta, com relação a uma planta do mesmo tipo em que a expressão do polipeptídeo não foi modulada.

O aumento em biomassa da planta pode ser útil no aumento da produção e qualidade em vegetais folhosos. A ramificação aumentada e acúmulo de biomassa podem também ser úteis em produção de grama de forragem e várias colheitas de cereal. O aumento em biomassa da planta pode resultar em uma abundância de etanol celulósico (tal como bioetanol), que pode ser usado como uma fonte de biocombustível.

O aumento em biomassa da planta é também esperado facilitar administração mais eficiente de fertilizantes de planta. Portanto, o aumento em biomassa da planta pode prevenir problemas ambientais tais como escoamentos do fertilizante que podem induzir a uma faixa de problemas ambientais tais como florescimento de algas.

Além disso, a expressão aumentada do polipeptídeo pode induzir ao florescimento precoce em plantas tais como cana-de-açúcar. Isto pode ser útil para cultivos comerciais visto que pode ajudar criadores de planta em práticas de reprodução de planta convencionais. Similarmente, o fenótipo de nanismo como um resultado da expressão aumentada do polipeptídeo pode também ser desejável na geração de plantas ornamentais.

Em um segundo aspecto, é fornecido um polinucleotídeo isolado selecionado do grupo que consiste em:

i) um polinucleotídeo antissense que compreende a sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15,

ii) um polinucleotídeo antissense que compreende pelo menos 15 resíduos de ácido nucleico contíguos selecionados da sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15; e

5 iii) um polinucleotídeo antissense que compreende pelo menos 15 resíduos de ácido nucleico contíguos de um polinucleotídeo que é complementar a uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1;

10 iv) um polinucleotídeo de interferência de RNA compreendendo uma sequência de ácido nucleico que compreende pelo menos 9 resíduos de ácido nucleico contíguos selecionados da sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15; e

15 v) um polinucleotídeo antissense que consiste na sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15; em que o polinucleotídeo é capaz de diminuir a expressão de um polipeptídeo que modula pelo menos uma característica em uma planta, ou

 vi) um polinucleotídeo que é complementar a qualquer um de i) a v), ou

20 vii) um polinucleotídeo que hibridiza sob condições rigorosas para qualquer um de i) a v).

De acordo com um terceiro aspecto, é fornecido um polinucleotídeo isolado selecionado do grupo que consiste em:

25 i) um polinucleotídeo que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de SEQ ID NO: 1;

30 ii) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que é selecionada do grupo que consiste em qualquer um ou mais do aminoácido 1 a aminoácido 7, de aminoácido 9 a aminoácido 230, de aminoácido 1 a aminoácido 58, de aminoácido 77 a aminoácido 485, de aminoácido 59 a aminoácido 76, de aminoácido 150 a aminoácido 191, de aminoácido 231 a aminoácido 405, e de aminoácido 406 a aminoácido 438 de SEQ ID NO: 1, ou em posições equivalentes em um

homólogo dos mesmos, e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta;

iii) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de
5 sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta; e

iv) um polinucleotídeo que consiste em uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de SEQ ID NO: 1;
em que o polinucleotídeo é capaz de aumentar a expressão de um polipeptídeo que modula pelo menos uma característica em uma planta, ou
10

v) um polinucleotídeo que é complementar a qualquer um de i) a iv); ou

vi) um polinucleotídeo que hibridiza sob condições rigorosas para qualquer um de i) a iv).

15 De acordo com um quarto aspecto, é fornecido um vetor compreendendo um polinucleotídeo de acordo com o segundo ou o terceiro aspecto.

De acordo com um quinto aspecto, é fornecido uma célula hospedeira transformada com um polinucleotídeo de acordo com o segundo ou
20 o terceiro aspecto, ou a vetor de acordo com o quarto aspecto.

De acordo com um sexto aspecto, é fornecido planta compreendendo uma célula hospedeira de acordo com o quinto aspecto.

De acordo com um sétimo aspecto, é fornecido um método de produzir planta transgênica compreendendo as etapas de:

25 a) fornecer um polinucleotídeo que modula a expressão de um polipeptídeo, em que o polipeptídeo é selecionado do grupo que consiste em:

i) um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1;

ii) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que é selecionada do grupo que consiste em qualquer um ou mais do
30 aminoácido 1 a aminoácido 7, de aminoácido 9 a aminoácido 230, de aminoácido 1 a aminoácido 58, de aminoácido 77 a aminoácido 485, de amino-

ácido 59 a aminoácido 76, de aminoácido 150 a aminoácido 191, de aminoácido 231 a aminoácido 405, e de aminoácido 406 a aminoácido 438 de SEQ ID NO: 1, ou em posições equivalentes em um homólogo dos mesmos, e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta;

5 iii) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta; e

 iv) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1;

10 b) transformar uma planta, parte da planta ou célula da planta com o polinucleotídeo de etapa (a), e

 c) cultivar a planta transformada, parte da planta ou célula da planta para produzir a planta transgênica.

15 Em uma modalidade, o polinucleotídeo na etapa (a) do sétimo aspecto compreende um polinucleotídeo isolado selecionado do grupo que consiste em:

 i) um polinucleotídeo antissense que compreende a sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15,

20 ii) um polinucleotídeo antissense que compreende pelo menos 15 resíduos de ácido nucleico contíguos selecionados da sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15; e

 iii) um polinucleotídeo antissense que compreende pelo menos 15 resíduos de ácido nucleico contíguos de um polinucleotídeo que é complementar a uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1;

25 iv) um polinucleotídeo de interferência de RNA compreendendo
30 uma sequência de ácido nucleico que compreende pelo menos 9 resíduos de ácido nucleico contíguos selecionados da sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15; e

v) um polinucleotídeo antissense que consiste na sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15;

em que o polinucleotídeo é capaz de modular a expressão de um polipeptídeo que modula pelo menos uma característica em uma planta, ou

5 vi) um polinucleotídeo que é complementar a qualquer um de i) a v), ou

vii) um polinucleotídeo que hibridiza sob condições rigorosas para qualquer um de i) a v).

10 Em outra modalidade, o polinucleotídeo na etapa (a) do sétimo aspecto compreende um polinucleotídeo isolado selecionado do grupo que consiste em:

i) um polinucleotídeo que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de SEQ ID NO: 1,

15 ii) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que é selecionada do grupo que consiste em qualquer um ou mais do aminoácido 1 a aminoácido 7, de aminoácido 9 a aminoácido 230, de aminoácido 1 a aminoácido 58, de aminoácido 77 a aminoácido 485, de aminoácido 59 a aminoácido 76, de aminoácido 150 a aminoácido 191, de aminoácido 231 a aminoácido 405, e de aminoácido 406
20 a aminoácido 438 de SEQ ID NO: 1, ou em posições equivalentes em um homólogo dos mesmos, e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta;

25 iii) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta; e

iv) um polinucleotídeo que consiste em uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de SEQ ID NO: 1, em que o polinucleotídeo é capaz de aumentar a expressão de um polipeptídeo que modula pelo menos uma característica em uma planta, ou
30

v) um polinucleotídeo que é complementar a qualquer um de i) a iv), ou

vi) um polinucleotídeo que hibridiza sob condições rigorosas para qualquer um de i) a iv).

Em uma modalidade do método de acordo com o sétimo aspecto, o cultivo na etapa (c) é cultivando planta transformada, parte da planta ou
 5 célula da planta sob condições que podem permitir o desenvolvimento da planta transformada, parte da planta ou célula da planta. Em certas modalidades, a parte da planta é selecionada do grupo que consiste em qualquer uma ou mais de raiz, tronco, folha, botão, flor, broto, semente e galho.

Em uma modalidade, é fornecida a planta de acordo com o sexto
 10 aspecto, em que a planta é uma planta monocotiledônea. Em outra modalidade, é fornecida a planta de acordo com o sexto aspecto, em que a planta é uma planta dicotiledônea.

Em certas modalidades, a planta é selecionada do grupo que consiste em qualquer uma ou mais de aveia, cevada, trigo, centeio, milho,
 15 arroz, sorgo, milho miúdo, amaranto, grama-do-reino, grama doce, cana, bambu, grama de forragem, capim diamante e capim turfa.

De acordo com um oitavo aspecto, é fornecido planta transgênica quando produzida pelo método de acordo com o sétimo aspecto, em que a planta é selecionada do grupo que consiste em qualquer uma ou mais de
 20 aveia, cevada, trigo, centeio, milho, arroz, sorgo, milho miúdo, amaranto, grama-do-reino, grama doce, cana, bambu, grama de forragem, capim diamante e capim-turfa.

Em uma modalidade, a planta transgênica é capaz de produzir plantas férteis.

25 De acordo com um nono aspecto, é fornecido uma parte ou uma semente da planta como definido acima. A parte pode ser selecionada do grupo que consiste em qualquer uma ou mais de raiz, tronco, folha, botão, flor, broto, semente e galho.

De acordo com um décimo aspecto, é fornecido planta ou material de propagação regenerado da mesma de uma planta como definido acima, ou uma parte ou uma semente como definido acima.
 30

De acordo com um décimo primeiro aspecto, é fornecido uso de

uma planta transformada com um polinucleotídeo como definido acima para biomassa da produção da planta. Em certas modalidades, a planta é selecionada do grupo que consiste em qualquer uma ou mais de aveia, cevada, trigo, centeio, milho, arroz, sorgo, milho miúdo, amaranto, grama-do-reino, grama doce, cana, bambu, grama de forragem, capim diamante e capim turfa.

De acordo com um décimo segundo aspecto, é fornecido uso de acordo com o décimo primeiro aspecto, em que a biomassa da produção da planta é para a produção de biocombustível.

De acordo com um décimo terceiro aspecto, é fornecido polipeptídeo isolado selecionado do grupo que consiste em:

i) um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1;

ii) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que é selecionada do grupo que consiste em qualquer um ou mais do aminoácido 1 a aminoácido 7, de aminoácido 9 a aminoácido 230, de aminoácido 1 a aminoácido 58, de aminoácido 77 a aminoácido 485, de aminoácido 59 a aminoácido 76, de aminoácido 150 a aminoácido 191, de aminoácido 231 a aminoácido 405, e de aminoácido 406 a aminoácido 438 de SEQ ID NO: 1, ou em posições equivalentes em um homólogo dos mesmos, e que é capaz de modular sinalização de citoquinina em uma planta;

iii) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina em uma planta; e

iv) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1, em que a modulação da expressão do polipeptídeo modula a expressão de pelo menos uma característica na planta.

30 Definições

As seguintes palavras e termos usados aqui devem ter o significado indicado:

O termo "contíguo" como aqui usado refere-se a uma série contínua ou uma não-rompida de resíduos de aminoácido ou resíduos de ácido nucleico presentes em um polipeptídeo ou polinucleotídeo, respectivamente. Por exemplo, "resíduos de aminoácido contíguos" serão entendidos incluir
5 uma sequência de aminoácido contígua de pelo menos cerca de 4, cerca de 5, cerca de 6, cerca de 7, cerca de 8, cerca de 9, cerca de 10, cerca de 12, cerca de 15, cerca de 20, cerca de 25, cerca de 30, cerca de 40, cerca de 50, cerca de 75, cerca de 100, cerca de 150, cerca de 200, cerca de 250, cerca de 300, cerca de 350 ou cerca de 400, cerca de 450, ou cerca de 485
10 aminoácidos mais ou menos. Similarmente, "resíduos de ácido nucleico contíguos" serão entendidos incluir uma sequência contígua de ácido nucleico de pelo menos cerca de 12, cerca de 15, cerca de 18, cerca de 21, cerca de 24, cerca de 27, cerca de 30, cerca de 36, cerca de 45, cerca de 60, cerca de 75, cerca de 90, cerca de 120, cerca de 150, cerca de 225, cerca de 300,
15 cerca de 450, cerca de 600, cerca de 750, cerca de 900, cerca de 1050, cerca de 1200, cerca de 1350, cerca de 1450, cerca de 1550, cerca de 1650, ou cerca de 1775 nucleotídeos mais ou menos.

O termo "sinalização de citoquinina" refere-se às moléculas que propagam um sinal extracelular através da membrana celular para tornar-se
20 um sinal intracelular. Este sinal pode então estimular uma resposta celular. As moléculas de polipeptídeo envolvidas em sinalização de processos de quitocina são tipicamente proteína quinases receptoras e não-receptoras, proteína fosfatases receptoras e não-receptoras, e fatores de transcrição. A sinalização de atividade de quitocina pode ser avaliada avaliando-se os ní-
25 veis de citoquinina expressos em plantas ou avaliando-se a atividade de ligação entre a citoquinina e as moléculas de polipeptídeo envolvidas nos processos de sinalização de citoquinina.

O termo "hibridização" quando usado com referencia a ácidos nucleicos refere-se ao processo em que dois polinucleotídeos de filamento
30 único ligam-se não-covalentemente para formar um polinucleotídeo de filamento duplo estável. o termo "hibridização" pode também referir-se a hibridização de filamento triplo. o polinucleotídeo de filamento duplo ou triplo resul-

tante é um "híbrido". A proporção da população de polinucleotídeos que forma híbridos estáveis é referida aqui como o "grau de hibridização." Hibridização e a resistência de hibridização (isto é, a intensidade da associação entre os ácidos nucleicos) é dependente de fatores tais como o grau de complementaridade entre os ácidos nucleicos, rigorosidade das condições envolvidas, o ponto de fusão térmica (T_m) do híbrido formado, e a relação G:C dentro dos ácidos nucleicos como descrito em detalhes também abaixo.

O termo "iniciador" como aqui usado refere-se a um polímero de nucleotídeos capaz de agir como um ponto de iniciação de síntese de DNA quando anelado a um padrão de ácido nucleico sob condições em que a síntese de um produto de extensão de iniciador é iniciada, isto é, na presença de quatro diferentes trifosfatos de nucleotídeo e uma polimerase em um tampão apropriado (que tipicamente inclui um tampão de pH e cofatores) e em uma temperatura adequada. Os iniciadores usados nas etapas de amplificação da invenção podem ser totalmente complementares ou substancialmente complementares às sequências-alvo.

Os termos "traço" e "fenótipo" são usados alternadamente e abrangem qualquer característica, especialmente uma que distingue uma planta da outra. Características exemplares incluem qualquer uma ou mais de altura da planta, biomassa da planta, grau de desenvolvimento de broto apical, grau de ramificação, planta, fertilidade de semente ou pólen, número ou início de florescimento, área da folha, início de senescência, início de germinação de semente, produção de semente, peso total ou individual da semente, grau de desenvolvimento de tronco, produção de grão, número de cultivos, grau de desenvolvimento de meristema floral e grau de desenvolvimento de raiz.

O termo "transgênico" quando usado em referência a um tecido ou a uma planta refere-se a um tecido ou planta, respectivamente, que compreende uma ou mais células que contêm um transgene, ou cujo genoma foi alterado pela introdução de um transgene. Células transgênicas, tecidos e plantas podem ser produzidas por diversos métodos incluindo a introdução de um "transgene" compreendendo ácido nucleico (DNA ou RNA) em uma

célula-alvo ou integração do transgene em um cromossoma de uma célula-alvo por meio de intervenção humana, tal como pelos métodos descritos aqui.

5 A palavra "substancialmente" não exclui "completamente", por exemplo, uma composição que é "substancialmente livre" de Y pode ser completamente livre de Y. Onde necessário, a palavra "substancialmente" pode ser omitida a partir da definição da invenção.

10 A menos que de outro modo especificado, os termos "compreendendo" e "compreende", e variantes gramaticais dos mesmos, são destinados a representar a linguagem "aberta" ou "inclusive" de modo que eles incluam os elementos mencionados, porém também permitam a inclusão de elementos adicionais, não-mencionados.

15 Como aqui usado, o termo "cerca de", no contexto de concentrações de componentes das formulações, tipicamente significa +/- 5% do valor estabelecido, mais tipicamente +/- 4% do valor estabelecido, mais tipicamente +/- 3% do valor estabelecido, mais tipicamente, +/- 2% do valor estabelecido, ainda mais tipicamente +/- 1% do valor estabelecido, e ainda mais tipicamente +/- 0,5% do valor estabelecido.

20 Em toda esta descrição, certas modalidades podem ser descritas em um formato de faixa. Deve ser entendido que a descrição em formato de faixa é meramente para conveniência e brevidade e não deve ser construída como uma limitação inflexível sobre o escopo das faixas descritas. Consequentemente, a descrição de uma faixa deve ser considerada ter todas as subfaixas possíveis especificamente descritas, bem como valores numéricos individuais dentro daquela faixa. Por exemplo, a descrição de
25 uma faixa tal como de 1 a 6 deve ser considerada ter subfaixas especificamente descritas tais como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., bem como números individuais dentro daquela faixa, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, e 6. Isto aplica-se independente da amplitude da faixa.

30 No contexto das faixas que descrevem os resíduos de aminoácido em um polipeptídeo ou resíduos de ácido nucleico em um polinucleotídeo deve ser entendido que a descrição de uma faixa inclui o primeiro e último

valores numéricos da faixa. Adicionalmente neste contexto, a descrição de uma faixa não se destina a abranger aminoácido individual ou resíduos de ácido nucleico que incluem-se na faixa. Por exemplo, a descrição de uma faixa, por exemplo "de aminoácido 1 a aminoácido 7", deve ser considerada

5 referir-se a uma sequência de aminoácido que transpõe e inclui os aminoácidos nas posições 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7, porém que não se refere a a qualquer um ou mais aminoácidos individuais que se situam dentro daquela faixa, por exemplo, aminoácido 1 apenas, aminoácido 2 apenas, aminoácidos 1 e 2, ou assim em diante.

10 Descrição Detalhada das Modalidades

As modalidades não-limitantes exemplares de um novo método para modular a expressão de um traço em uma planta, bem como materiais for uso em e produzidos pelo novo método, serão agora descritos.

A presente invenção é baseada na identificação de que o polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 está envolvido em uma trilha de sinalização de citoquinina em plantas.

15

As citoquininas são uma classe de hormônios de planta que regula o crescimento e desenvolvimento da planta de uma variedade de maneiras. Elas são ativas na promoção de divisão celular, crescimento e diferenciação celular e outras funções reguladoras do crescimento em uma planta. As citoquininas são acreditadas por desempenharem um importante papel em todas as fases de desenvolvimento da planta de divisão e aumento celular para a formação de flores e frutos. Por exemplo, as citoquininas são capazes de promover o alongamento de botões e o crescimento de folhas, e de inibir a senilidade, acúmulo de aminoácidos e abertura do estoma.

20

25

A estrutura básica de uma citoquinina compreende uma 6-amino purina, da qual o grupo amino é modificado com um substituinte geralmente transportando 5 átomos de carbono. As citoquininas ativas de ocorrência natural em plantas maiores são principalmente derivados de zeatina e isopentenil adenina de precursores biossintéticos. Os níveis elevados de citoquinina estão associados com o desenvolvimento de sementes em plantas

30

maiores, quando este foi demonstrado coincidir com atividade mitótica máxima no endosperma de sementes de milho em desenvolvimento e outros grãos de cereal.

Os mecanismos moleculares básicos de biossíntese de citoquinina e transdução de sinal tornaram-se claros apenas recentemente. Três membros da família de receptor de citoquinina, que são histidina quinases sensoras, foram identificados e têm funções que são similares às trilhas de transdução de sinal de dois componentes bacterianos envolvendo mecanismos fosforeposicionamento. Estes três receptores de citoquinina, AHK2, AHK3 e CRE1/AHK4, mostram um grau elevado de identidade de sequência, porém cada um tem características de diferenciação e é requerido para percepção de citoquinina normal e crescimento da planta. Enquanto análise mutacional foi realizada sobre estes três receptores, mutações em qualquer um dos três receptores não resultaram em significativa alteração dos fenótipos da planta. Ao contrário, mutações em todos os três receptores (isto é, um mutante triplo) resultaram em plantas nanicas e estéreis. Estes fenótipos não foram observados nos mutantes antissense da presente invenção como descrito abaixo.

Na sinalização de *Arabidopsis* de trilha de citoquinina, as histidina proteína quinases (AHKs) servem como receptores de citoquinina e transmitem sinais de AHKs para reguladores de resposta nuclear (ARRs) por meio de proteínas de fosfotransferência de histidina (AHPs). As AHPs movem-se do citoplasma para o núcleo de uma maneira dependente da citoquinina e enviam sinais para ARRs no núcleo, que pode ativar ou reprimir a transcrição de genes envolvidos em crescimento e desenvolvimento de planta dentro da célula da planta.

É descrito aqui um polipeptídeo isolado, HOG1 (compreendendo uma sequência de aminoácido mencionada na SEQ ID NO: 1), purificada da planta *Arabidopsis thaliana*, que liga-se às citoquininas com alta afinidade. Além disso, os presentes inventores identificaram que a modulação da expressão do polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO: 1 modula a sinalização de trilha de citoquinina em ambas as plantas monocotiledôneas e dicoti-

ledôneas, resultando em uma expressão de diferentes características em plantas, a despeito da ausência do domínio de histidina quinase. Em algumas modalidades, o polipeptídeo descrito também não possui atividade de SAHH.

5 Em certas modalidades, o polipeptídeo descrito compreende um domínio de transmembrana.

Desse modo, a presente invenção fornece um método de modular a expressão de pelo menos uma característica em uma planta, compreendendo uma etapa de modulação da expressão de pelo menos um polipeptídeo pela planta, em que o polipeptídeo é selecionado do grupo que consiste em:

i) um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1;

15 ii) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que é selecionada do grupo que consiste em qualquer um ou mais do aminoácido 1 a aminoácido 7, de aminoácido 9 a aminoácido 230, de aminoácido 1 a aminoácido 58, de aminoácido 77 a aminoácido 485, de aminoácido 59 a aminoácido 76, de aminoácido 150 a aminoácido 191, de aminoácido 231 a aminoácido 405, e de aminoácido 406 a aminoácido 438 de
20 SEQ ID NO: 1, ou em posições equivalentes em um homólogo dos mesmos, e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta;

25 iii) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta; e

iv) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1,
em que a modulação da expressão do polipeptídeo modula a expressão de pelo menos uma característica na planta.

30 A trilha de sinalização de qualquer citoquinina pode ser modulada usando o método da presente invenção. Existem mais do que 200 citoquininas naturais e sintéticas que são conhecidas até hoje (<http://www.plant->

hormones.info/citoquininas.htm; Arteca, planta Growth Substances: Principles e Applications, Nova Iorque: Chapman & Hall (1996); Salisbury e Ross, planta *Physiology* pp. 357-407, 531-548 (1992)). Citoquininas de ocorrência natural exemplares incluem zeatina, quinetina, isopenteniladenina e 6-Benzilaminopurina enquanto fenilureias tais como difenilureia representa uma classe exemplar de citoquininas sintéticas. Formas conjugadas de citoquininas que podem ser produzidas de diversas maneiras são também conhecidas e incluídas dentro do escopo da invenção. Por exemplo, glucosídeos podem ser formados pela ligação de carbono 1 de glicose ao grupo hidroxila sobre a cadeia lateral de zeatina ou o carbono 1 pode ligar-se ao átomo de N da ligação C-N em qualquer posição 7 ou 9 sobre o anel de adenina.

O método descrito pode também ser aplicado a qualquer planta em que a modulação de uma ou mais características é desejada. O termo "planta" como aqui usado também abrange plantas inteiras, antepassados e progênie das plantas e partes de planta, incluindo sementes, brotos, troncos, folhas, raízes (incluindo tubérculos), flores, e tecidos e órgãos, em que cada dos anteriormente mencionados compreende o polinucleotídeo ou polipeptídeo da invenção. O termo "planta" também abrange células de planta, culturas de suspensão, tecido de calos, embriões, regiões meristemáticas, gametófitos, esporófitos, pólen, e microsporos, novamente onde cada dos anteriormente mencionados compreendem o polinucleotídeo de interesse.

Plantas que são particularmente úteis nos métodos da invenção incluem todas as plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas tais como colheitas para alimentação, gramas, legumes de forragem ou legumes para forragem, plantas ornamentais, árvores, ou arbustos bem como plantas usadas para biomassa celulósica para etanol (biocombustível) produção selecionada da lista compreendendo *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Agropyron* spp., *Allium* spp., *Amarantous* spp., *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium* spp., *Arabidopsis thaliana*, *Arachis* spp, *Artocarpus* spp., *Aspargo officinalis*, *Avena sativa*, *Averrhoa carambola*, *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsea*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp., *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna in-*

- dica, *Capsicum* spp., *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carthamus tinctorius*, *Carya* spp., *Castanea* spp., *chrysanthemum*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum* spp., *Citnillus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Cola* spp., *Colocasia esculenta*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp., *Cucumis* spp., *Cucurbita* spp., *Cynara* spp., *Daucus carota*, *Desmodium* spp., *Dimocarpus longan*, *Dioscorea* spp., *Diospyros* spp., *Echinochloa* spp., *Eleusine coracana*, *Eriobotrya japonica*, *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp., *Fagus* spp., *Ficus carica*, *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp., *Gossypium hirsutum*, *HelianDesse modo* spp., *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp., *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp., *Lactuca sativa*, *Lathyrus* spp., *Lemna* spp., *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lolium perenne*, *Lotus* spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus* spp., *Macrotyloma* spp., *Malpighia emarginata*, *Malus* spp., *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus* spp., *Mentha* spp., *Momordica* spp., *Morus nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Omithopus* spp., *Oryza* spp., *Panicum miliaceum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Petunia hybrida*, *Phaseolus* spp., *Phoenix* spp., *Physalis* spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes* spp., *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Sambucus* spp., *Secale cereale*, *Sesamum* spp., *Solanum* spp., *Sorgo bicolor*, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Triücosecale rimpau*, *Triticum* spp., *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp., entre outras.

Em uma modalidade, a planta é uma colheita de grão tal como arroz, trigo, milho, soja, milho miúdo, cevada, centeio, aveia, ou sorgo. Em outra modalidade, a planta é uma grama tal como grama-do-reino, grama doce, cana, bambu, grama de forragem, capim diamante e capim turfa. Em ainda outra modalidade, a planta é um vegetal tal como *Brassica alboglabra*, alcachofra, aspargo, brócolos, Couve-de-Bruxelas, repolho, canola, cenoura, couve-flor, aipo, *collard greens*, linho, cou, e lentilha, ou outras plantas que

têm valor comercial ou científico (tal como *Arabidopsis thaliana*, *Petunia hybrida*, crisântemo etc.).

Como descrito abaixo nos Exemplos 1 e 2, os métodos descritos foram demonstrados em ambas as plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. Portanto, por que a sequência do polipeptídeo de SEQ ID NO: 1 é altamente conservada entre espécies de planta, espera-se que os métodos descritos sejam aplicáveis a plantas tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas. Por exemplo, como os métodos descritos foram demonstrados em arroz (*Oryza sativa*) como descrito no Exemplo 2 abaixo, seria esperado ser aplicável à outras plantas monocotiledôneas, tais como trigo (*Triticum aestivum*) (SEQ ID NO: 7) que tem uma identidade de sequência de aminoácido de 95% para o arroz (SEQ ID NO: 5). Similarmente, como os métodos descritos foram demonstrados em *Arabidopsis thaliana* como descrito no Exemplo 1 abaixo, seria esperado ser aplicável à outras dicotiledôneas plantas, tais como *Petunia hybrida* (SEQ ID NO: 13) que têm uma identidade de sequência de aminoácido a 88% para *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 1), e crisântemo (SEQ ID NO: 9) que tem uma identidade de sequência de aminoácido a 92% para *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 1).

O termo "expressão" como aqui usado pode referir-se à expressão de um traço, um gene, ou um produto de gene, incluindo o polipeptídeo codificado, em uma planta.

As características de planta que podem ser moduladas pelo método descrito incluem, porém não estão limitadas a, altura da planta, biomassa da planta, desenvolvimento de botão apical, ramificação, fertilidade, florescimento, área da folha, senescência, germinação de semente, produção de semente, peso de semente, desenvolvimento de tronco, produção de grão, número de cultivos, desenvolvimento de meristema floral e desenvolvimento de raiz. De acordo com uma modalidade, a expressão de um traço em uma planta pode ser modulada para exibir ramificação aumentada, produção de semente aumentada, biomassa da planta aumentada, produção de grão aumentada, número de cultivos aumentado, área da folha aumentada, germinação de semente retardada, predominância apical diminuída, flores-

cimento retardado, ou combinações dos mesmos, com relação a uma planta do mesmo tipo em que a expressão do polipeptídeo não foi modulada. Em outra modalidade, a expressão de um traço em uma planta pode ser modulada para exibir florescimento precoce, nanismo, número diminuído de fo-

5 lhas, senescência precoce, germinação de semente precoce, formação retardada e reduzida de folhas de roseta, crescimento de raiz de muda aumentado, ou combinações dos mesmos, com relação a uma planta do mesmo tipo em que a expressão do polipeptídeo não foi modulada.

Em particular, produção de semente e biomassa da planta foram

10 significativamente aumentadas em cerca de 2 a cerca de 5 vezes para plantas em que a expressão do polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO: 1 foi diminuída com relação àquela de uma planta do mesmo tipo sem a expressão diminuída do polipeptídeo. Dependendo do tipo de planta, a modulação na expressão do polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO: 1, e a extensão

15 da modulação, a produção de semente e biomassa da planta podem respectivamente ser esperadas aumentar em cerca de 2 vezes, cerca de 2,5 vezes, cerca de 3 vezes, cerca de 3,5 vezes, cerca de 4 vezes, cerca de 4,5 vezes ou cerca de 5 vezes.

Similarmente, a produção de grão e número de cultivos foram

20 aumentados em cerca de 2 a cerca de 4 vezes para plantas em que a expressão do polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO: 1 foi diminuída com relação àquela de uma planta do mesmo tipo sem a expressão diminuída do polipeptídeo. Dependendo do tipo de planta, a modulação na expressão do polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO: 1, e a extensão da modulação, a

25 produção de grão e número de cultivos podem respectivamente ser esperados aumentar em cerca de 2 vezes, cerca de 2,5 vezes, cerca de 3 vezes, cerca de 3,5 vezes, ou cerca de 4 vezes.

Em modalidades particulares, a área da folha foi também significativamente aumentada em cerca de 2 a cerca de 6 vezes para plantas em

30 que a expressão do polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO: 1 foi diminuída com relação àquela de uma planta do mesmo tipo sem a expressão diminuída do polipeptídeo. Dependendo do tipo de planta, a modulação na ex-

pressão do polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO: 1, e a extensão da modulação, a área da folha pode ser esperada aumentar em cerca de 2 vezes, cerca de 2,5 vezes, cerca de 3 vezes, cerca de 3,5 vezes, cerca de 4 vezes, cerca de 4,5 vezes, cerca de 5 vezes, cerca de 5,5 vezes, ou cerca de 6 vezes.

Para plantas em que a expressão do polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO: 1 foi aumentada, o florescimento foi avançado em cerca de 5 a cerca de 15 dias com relação a uma planta do mesmo tipo sem a expressão aumentada do polipeptídeo. Como descrito acima, a modulação em tempo de florescimento dependerá do tipo de planta, a modulação na expressão do polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO: 1, e a extensão da modulação, porém tipicamente seria avançada em cerca de 4 dias, cerca de 5 dias, cerca de 6 dias, cerca de 7 dias, cerca de 8 dias, cerca de 9 dias, cerca de 10 dias, cerca de 11 dias, cerca de 12 dias, cerca de 13 dias, cerca de 14 dias, ou cerca de 15 dias.

Em certas modalidades, a fertilidade das plantas não é modulada e as plantas transformadas são capazes de produzir sementes férteis.

A expressão de um traço pode ser determinada usando vários métodos conhecidos na técnica. Área da folha, por exemplo, pode ser determinada avaliando-se a relação da área total da folha para a área da folha (LAR), índice da área da folha (LAI) ou área específica da folha (SLA) usando as seguintes equações, respectivamente:

$$\text{LAR}(\text{m}^2\text{g}^{-1} \text{ ou } \text{m}^2\text{kg}^{-1}) = (\text{total área da folha}) / (\text{peso seco total})$$

$$\text{LAI} = \frac{(\text{área total da folha da colheita})}{(\text{área total da terra na qual repousa})}$$

$$\text{SLA} (\text{m}^2\text{g}^{-1}) = (\text{área da folha}) / (\text{massa seca da folha})$$

Alternativamente, a área da folha pode ser medida usando análise de imagem com base em computador.

A produção de semente pode também ser medida de diversas maneiras, por exemplo como um aumento ou decréscimo de mil no peso de semente, como um aumento ou decréscimo do número de sementes carrega-

gadas, como peso total de semente, como tamanho da semente, ou como índice de colheita.

Diferenças em altura da planta pode ser avaliada por medições diretas e comparação com as alturas das plantas de controle não-modificadas.

A biomassa da planta pode ser determinada pesando-se as plantas recentemente colhidas (peso fresco ou peso úmido) ou o peso seco constante. O peso seco pode ser determinado após a secagem da planta colhida ou partes da planta de interesse (por exemplo, folhas, sementes) em um forno de secagem estabelecido em cerca de 80°C durante 2 dias a 7 dias até o peso constante ser registrado (peso seco). Similarmente, o peso da semente ou grão e semente total ou produção de grão por planta ou por área unitária de cultivo (por exemplo, por metro quadrado, acre ou hectare) podem ser determinados.

Mudanças em desenvolvimento de broto apical e ramificação bem como fertilidade, florescimento, e senescência podem ser estimados comparando-se o desenvolvimento das plantas modificadas (por exemplo, geneticamente modificadas como descrito nesta descrição) com a aparência das plantas não-modificadas no mesmo estágio de crescimento.

O número de cultivos (ou número de galhos) por planta pode ser determinado contando-se uma amostra representativa de plantas desenvolvidas até todos os cultivos terem se desenvolvido (por exemplo, em *cultivars* de arroz pode demorar cerca de 2 meses antes do cultivo atingir um número máximo). Estes podem ser comparados ao número de cultivos por planta das plantas não-modificadas.

O desenvolvimento de meristema floral e o desenvolvimento de raiz podem ser examinados tanto no nível macroscópico (por exemplo por observações visuais em estágios comparáveis de desenvolvimento) bem como por microscopia (por exemplo por microscopia de luz ou elétron) para diferenças em disposição celular etc.

A expressão de um gene pode ser determinada, por exemplo, medindo-se a produção de níveis de transcrição de RNA mensagei-

ro(mRNA). A expressão de um produto de gene de polipeptídeo pode ser determinada, por exemplo, por imunoensaio usando um anticorpo(s) que se liga(m) com o polipeptídeo.

O termo "modular" refere-se a uma mudança na expressão de um traço, um gene, ou um produto de gene, incluindo o polipeptídeo codificado, em uma planta. Tipicamente, a mudança é com relação a uma planta do mesmo tipo em que a expressão do traço, gene ou polipeptídeo não foi modulada. Por exemplo, quando usado com referência a uma expressão de um traço, o termo "modular" pode referir-se à altura da planta aumentada ou diminuída, biomassa da planta aumentada ou diminuída, desenvolvimento de broto apical aumentado ou diminuído, ramificação aumentada ou diminuída, fertilidade aumentada ou diminuída, florescimento aumentado ou diminuído, área da folha aumentada ou diminuída, senescência precoce ou retardada, germinação de semente precoce ou retardada, número de sementes aumentado ou diminuído, produção de semente aumentada ou diminuída, peso de semente aumentado ou diminuído, desenvolvimento de tronco precoce ou retardado, desenvolvimento de tronco aumentado ou diminuído, produção de grão aumentada ou diminuída, número de cultivos aumentado ou diminuído, desenvolvimento de meristema floral aumentado ou diminuído, desenvolvimento de meristema floral precoce ou retardado, desenvolvimento de raiz aumentado ou diminuído, desenvolvimento de raiz precoce ou retardado, e similares, em uma planta em que a expressão do polipeptídeo foi modulada usando o método descrito com relação a uma planta do mesmo tipo em que a expressão do polipeptídeo não foi modulada. Em uma modalidade, o traço modulado pode ser ramificação aumentada, produção de semente aumentada, biomassa da planta aumentada, produção de grão aumentada, número de cultivos aumentado, área da folha aumentada, germinação de semente retardada, predominância apical diminuída, florescimento retardado, ou combinações dos mesmos, em uma planta em que a expressão do polipeptídeo foi modulada usando o método descrito com relação a uma planta do mesmo tipo em que a expressão do polipeptídeo não foi modulada. Em outras modalidades, o traço modulado pode ser florescimento

precoce, nanismo, número diminuído de folhas, senescência precoce, germinação de semente precoce, formação retardada e reduzida de folhas de roseta, crescimento de raiz de muda aumentado, ou combinações dos mesmos, em uma planta em que a expressão do polipeptídeo foi modulada usando o método descrito com relação a uma planta do mesmo tipo em que a expressão do polipeptídeo não foi modulada.

Por "desenvolvimento", entende-se o processo pelo qual a planta ou parte da planta desenvolve-se, por meio de crescimento e diferenciação celular, para atingir a maturidade.

Quando usado com referência a uma expressão de um gene ou produto de gene, o termo "modular" tipicamente refere-se a um aumento ou um decréscimo no nível de expressão. Em algumas modalidades, o decréscimo no nível de expressão do gene ou produto de gene inclui completa inibição da expressão do gene ou produto de gene. Em certas modalidades, o decréscimo no nível de expressão do gene ou produto de gene não é uma completa inibição da expressão do gene ou produto de gene.

Em algumas modalidades, quando o nível de expressão do polipeptídeo HOG1 (SEQ ID NO: 1) é aumentado em cerca de 3 a cerca de 20 vezes quando comparado ao tipo selvagem, o nível de citoquinina é diminuído em cerca de 20 a cerca de 85 por cento, cerca de 30 a cerca de 75 por cento, cerca de 40 a cerca de 65 por cento, ou cerca de 50 a cerca de 55 por cento. Este decréscimo em nível de citoquinina pode resultar na modulação da expressão de características tais como germinação avançada da semente em cerca de 4 a 5 cerca de dias, retardo de crescimento, e formação e expansão retardada de novas folhas de roseta. Em outras modalidades, quando o nível de expressão do polipeptídeo HOG1 (SEQ ID NO: 1) é diminuído em cerca de 2 a cerca de 10 vezes quando comparado ao tipo selvagem, o nível de citoquinina é aumentado em cerca de 20 a cerca de 85 por cento, cerca de 30 a cerca de 75 por cento, cerca de 40 a cerca de 65 por cento, ou cerca de 50 a cerca de 55 por cento. Este aumento em nível de citoquinina pode resultar na modulação da expressão de características tais como germinação de semente retardada em cerca de 5 dias. Como pode ser

observado a partir dos exemplos abaixo, a expressão de características está relacionada ao nível de expressão da citoquinina. Métodos para aumentar ou reduzir o nível de expressão do gene ou produto de gene são também descritos novamente abaixo.

5 Alternativamente, o termo "modular" pode referir-se a uma mudança nas propriedades biológicas ou funcionais de um gene ou um produto de gene, incluindo o polipeptídeo codificado, na planta. Por exemplo, a modulação pode causar uma mudança na afinidade de ligação do polipeptídeo codificado. Em certas modalidades, a modulação não causa uma mudança
10 na sequência de ácido nucleico do gene ou a sequência de aminoácido do polipeptídeo codificado.

 Tipicamente, a expressão de um ou mais características em uma planta é modulada por modulação da expressão de um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1.
15 "Polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados alternadamente aqui para referir-se a um polímero de resíduos de aminoácido (dipeptídeo ou maior) de acordo com a SEQ ID NO: 1 ligada por meio de ligações de peptídeo ou ligações de peptídeo, e à variantes e análogos sintéticos do mesmo. Desse modo, estes termos incluem polímeros de aminoácido de acordo com a SEQ
20 ID NO: 1 em que um ou mais resíduos de aminoácido é um aminoácido de ocorrência não-natural sintético, tal como um análogo químico de um aminoácido de ocorrência natural correspondente, bem como os polímeros de aminoácido de ocorrência natural. Polipeptídeos da presente invenção incluem, porém não estão limitados a, produtos naturalmente purificados, produtos de procedimentos sintéticos químicos, e produtos produzidos por técnicas recombinantes de um hospedeiro procariótico ou eucariótico, incluindo,
25 por exemplo, células bacterianas, levedura, planta maior, inseto e de mamíferos. Os polipeptídeos da invenção podem compreender componentes não-peptídicos, tais como grupos de carboidrato. Carboidratos e outros substituintes não-peptídicos podem ser adicionados a um polipeptídeo pela célula
30 em que o polipeptídeo é produzido, e variarão com o tipo de célula. Para polipeptídeos que são preparados recombinantemente, a natureza e exten-

são das modificações em grande parte serão determinados pela capacidade de modificação pós-translacional da célula hospedeira particular e os sinais de modificação que estão presentes na sequência de aminoácido do polipeptídeo em questão. Por exemplo, padrões de glicosilação variam entre diferentes tipos de célula hospedeira. Polipeptídeos são definidos aqui, em termos de suas estruturas de cadeia principal de aminoácido; substituintes tais como grupos carboidrato são geralmente não especificados, porém podem estar presentes todavia. Além disso, os polipeptídeos da invenção podem também incluir um resíduo de metionina modificado inicial, em alguns casos como um resultado de processos mediados pelo hospedeiro. As proteínas podem estar presente como proteínas monoméricas ou como proteínas multiméricas, por exemplo, como dímeros (homo ou heterodímeros) ou trímeros.

Tipicamente, o polipeptídeo, a expressão do qual deve ser modulada na presente invenção, inclui dentro de seu escopo uma variante ou fragmento da mesma, em que a variante ou fragmento tem atividade biológica que é funcionalmente a mesma do polipeptídeo definido na SEQ ID NO:1. Em certas modalidades, a atividade biológica é ligação de citoquinina e atividade de receptor. A atividade de receptor envolve a propagação de um sinal extracelular através da membrana celular para tornar-se um sinal intracelular que pode iniciar uma ou mais respostas celulares em ligação da citoquinina ao receptor. Métodos para identificar a ligação de citoquinina e atividade de receptor são bem-conhecidos na técnica e são descritos nos Exemplos 1 e 2 abaixo.

Os fragmentos podem conter deleções de aminoácido simples ou múltiplo de terminal do polipeptídeo ou de estiramentos internos da sequência de aminoácido primária. Os fragmentos preferivelmente compreendem pelo menos n aminoácidos consecutivos da sequência origem e, dependendo da sequência particular, n é preferivelmente 7 ou mais (por exemplo, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400 ou mais).

Em uma modalidade, n é 7.

Em uma modalidade, n é 18.

Em uma modalidade, n é 33.

Em uma modalidade, n é 42.

Em uma modalidade, n é 58.

5 Em uma modalidade, n é 175.

Em uma modalidade, n é 222.

Em uma modalidade, n é 409.

Tais fragmentos podem ser "livre repouso", isto é, não parte de ou fundido a outros aminoácidos ou polipeptídeos, ou eles podem estar
10 compreendidos dentro de um polipeptídeo maior do qual eles fazem parte ou região. Quando compreendido dentro de um polipeptídeo maior, o fragmento da invenção mais preferivelmente forma uma única região contínua. Adicionalmente, diversos fragmentos podem ser compreendidos dentro de um único polipeptídeo maior.

15 A invenção também inclui equivalentes funcionais de um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1. Os fragmentos de polipeptídeo e equivalentes funcionais da invenção retêm a atividade biológica do polipeptídeo origem, isto é, uma atividade de ligação e receptora de citoquinina. Métodos para identificar a ati-
20 vidade de ligação e receptora de citoquinina são bem-conhecidos na técnica e são descritos nos Exemplos 1 e 2 abaixo.

Os polipeptídeos funcionalmente equivalentes da invenção incluem polipeptídeos que são homólogos a um polipeptídeo como mencionado na SEQ ID NO: 1. Dois polipeptídeos são ditos serem "homólogos" se a
25 sequência de um dos polipeptídeos tem um grau suficientemente elevado de identidade para a sequência do outro polipeptídeo. As frases "identidade percentual", "% de identidade", "identidade de proteína", "identidade de sequência" etc. quando aplicadas às sequências de polipeptídeo, referem-se à percentagem de pareamentos de resíduos idênticos entre pelo menos duas
30 sequências de polipeptídeo alinhadas usando um algoritmo padronizado. Um tal algoritmo pode inserir, de um modo padronizado e reproduzível, intervalos nas sequências que estão sendo comparadas a fim de otimizar o alinha-

mento entre duas sequências, portanto, obter uma comparação mais significativa das duas sequências.

A identidade percentual pode ser determinada usando um ou mais algoritmos ou programas de computador conhecidos na técnica ou descritos aqui. Graus de identidade podem ser facilmente calculados por pessoas versadas na técnica (veja, por exemplo: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nova Iorque, 1988; Bio-computing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nova Iorque, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., e Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nova Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; e Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. e Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nova Iorque, 1991).

Métodos de avaliação da identidade de sequência de proteína são bem-conhecidos na técnica e serão entendidos por aqueles versados na técnica que no presente contexto, a identidade de sequência é calculada com base de identidade de aminoácido (algumas vezes referida como "homologia rigorosa"). Por exemplo, o Pacote UWGCG fornece o programa BESTFIT que pode ser usado para calcular a identidade de sequência (por exemplo usada em suas fixações de parâmetros) (Devereux e outros, (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395). Os algoritmos PILEUP e BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) podem ser usados para calcular a identidade de sequência ou alinhamento de sequências (tipicamente em suas fixações de parâmetro), por exemplo, como descrito no Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300 e em Altschul, S, F e outros, (1990) J Mol Biol 215:403.

Software para realizar análises BLAST é disponibilizado por diversas fontes, incluindo o National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, e na internet em, por exemplo, "www.ncbi.nlm.nih.gov/". Este algoritmo envolve primeiro a identificação de par de sequência de classificação elevada (HSPs) por identificação de palavras curtas de comprimento W na sequência de indagação que ou compara ou satisfaz algum escore T limítrofe de valor positivo quando alinhado com

uma palavra do mesmo comprimento em uma sequência de base de dados. T está referido como o limite de escore de palavra vizinha (Altschul e outros, supra). Estes alcances de palavra vizinha iniciais agem como sementes para pesquisas de iniciação para encontrar HSPs contendo-os. Os alcances de
 5 palavra são estendidos em ambas as direções ao longo de cada sequência até o escore de alinhamento cumulativo poder ser aumentado.

Desse modo, a identidade de sequência, como referida aqui, pode, por exemplo, ser determinada usando BLAST versão 2.1.3 (ou outras versões do mesmo) usando os parâmetros de referência especificados pelo
 10 NCBI (o National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Blosum 62 matriz; penalidade aberta de intervalo=11 e penalidade de extensão de intervalo=1].

Em certas modalidades, as fixações de parâmetro dos algoritmos/programas anteriormente mencionados são usados.

15 Tipicamente, mais do que 50% de identidade entre dois polipeptídeos são considerados ser uma indicação de equivalência funcional, contanto que a atividade do polipeptídeo de referência seja mantida. Polipeptídeos mais preferidos têm graus de identidade maiores do que 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%,
 20 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99% de identidade total de sequência para o aminoácido representado por SEQ ID NO: 1.

Usando <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, foi mostrado que o polipeptídeo de *Arabidopsis thaliana* HOG1 da invenção (SEQ ID NO: 1) geralmente compartilha cerca de 80 a 95% de identidade de sequência de aminoácido para este homólogo em arroz (isto é, o OsCBP) (SEQ ID NO: 5),
 25 trigo (SEQ ID NO: 7), crisântemo (SEQ ID NO: 9) e *Petunia hybrida* (isto é, o PETCBP) (SEQ ID NO: 13). Mais especificamente, o polipeptídeo de *Arabidopsis thaliana* HOG1 (SEQ ID NO: 1) compartilha cerca de 90% de identidade de sequência de aminoácido com seu homólogo em arroz (SEQ ID NO:
 30 5), cerca de 91% de identidade de sequência de aminoácido com seu homólogo em trigo (SEQ ID NO: 7), cerca de 92% de identidade de sequência de

aminoácido com seu homólogo em crisântemo (SEQ ID NO: 9), cerca de 88% identidade de sequência de aminoácido com seu homólogo em *Petunia hybrida* (SEQ ID NO: 13), cerca de 99% identidade de sequência de aminoácido com seu homólogo em *Brassica alboglabra* (SEQ ID NO: 11), cerca de 90% identidade de sequência de aminoácido com seu homólogo em *Solanum tubérculoosum* (SEQ ID NO: 29) e cerca de 89% de identidade de sequência de aminoácido com seu homólogo em *Lycopersicon esculentum* (SEQ ID NO: 27).

Polipectídeos funcionalmente equivalentes de acordo com a invenção destinam-se a incluir polipeptídeos em que em uma ou mais posições neste contexto foram inserções, deleções, ou substituições de aminoácido, ou conservativos ou não-conservativos, contanto que tais mudanças resultem em uma proteína que retém uma atividade de ligação e receptora de citoquinina do polipeptídeo-origem. Cada destes tipos de mudanças pode ocorrer sozinho, ou em combinação com os outros, uma ou mais vezes em uma determinada sequência. Tais variantes podem, por exemplo, ser feitas usando os métodos de construção de proteína e mutagênese direcionada ao sítio.

As proteínas de fusão podem também ser construídas para melhorar características da proteína HOG1, e seus homólogos, ou variantes ou fragmentos da mesma. Por exemplo, uma região de aminoácidos adicionais, particularmente aminoácidos carregados, podem ser adicionada à terminação N da proteína HOG1, e seus homólogos, ou variante ou fragmento da mesma, para melhorar a estabilidade durante a purificação de uma célula hospedeira. Alternativamente, porções de peptídeo podem ser adicionadas ao polipeptídeo para facilitar a purificação. Tais regiões podem ser removidas antes da preparação final do polipeptídeo. A adição de porções de peptídeo para facilitar a manipulação de polipeptídeos são técnicas de rotina bem-conhecidas por aqueles versados na técnica.

Os polipeptídeos da invenção podem ser preparados por uma variedade de métodos, tais como por purificação de uma planta e por métodos recombinantes. Polipeptídeos da invenção, particularmente fragmentos

de peptídeo curtos, podem também ser produzidos por síntese química tal como por técnicas de síntese de fase líquida ou sólida convencionais (veja, por exemplo, os métodos descritos em Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill). Alternativamente, peptí-
5 deos podem ser produzidos por digestão de um polipeptídeo da invenção com proteinases tais como endoLys-C, endoArg-C, endoGlu-C e estafilococo V8-protease.

Purificação dos polipeptídeos da invenção pode ser realizada por quaisquer, ou uma combinação de, técnicas tais como cromatografia por
10 exclusão de tamanho, cromatografia de permuta de íon e cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa. Detecção *in vitro* dos polipeptídeos ou variantes ou fragmentos dos mesmos da presente invenção pode ser obtida usando uma variedade de técnicas incluindo ELISA (ensaio imunoabsorvente ligado por enzima), western blotting, imunoprecipitação, imuno-
15 nofluorescência, cromatografia de camada fina, cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa, análise de aminoácido após hidrólise de ácido e por análise espectrométrica de massa de bombardeio de átomo rápido (FAB). Tais técnicas são comumente usadas por aqueles versados na técnica.

20 Usando métodos que são conhecidos na técnica, o polipeptídeo da invenção (SEQ ID NO: 1) foi mostrado compreender duas assinaturas conservadas de SAHH. Na segunda assinatura de SAHH, três resíduos de glicina conservados representando o domínio de ligação de dinucleotídeo foram identificados. As citoquininas são derivados de nucleotídeo, é previsto
25 que estes resíduos podem formar um domínio de ligação de citoquinina. Os domínios de transmembrana putativa foram também identificados nas posições de aminoácido 1 a 7 (na terminação N), posições 150 a 191 e posições 59 a 76 de SEQ ID NO: 1.

Outros domínios de ligação de citoquinina putativa foram identifi-
30 cados nas posições de aminoácido 9 a 230 (na terminação N), posições 77 a 485 e posições 406 a 438 (na terminação C). Um domínio de ligação de NAD⁺ putativo foi identificado nas posições de aminoácido 231 a 405. Um

domínio intracelular de terminal N foi identificado nas posições de aminoácido 1-58.

Em certas modalidades, a expressão do polipeptídeo na planta é modulada introduzindo em uma ou mais células da planta um polinucleotídeo que modula a expressão do polipeptídeo. O polinucleotídeo da presente invenção pode ser na forma de RNA, tal como mRNA, ou na forma de DNA, incluindo, por exemplo, cDNA e DNA genômico que podem ser obtidos por clonagem ou que podem ser produzidos sinteticamente. O DNA pode ser de filamento duplo ou filamento único. DNA ou RNA de filamento único pode ser o filamento de codificação, também conhecido como o filamento de sentido, ou ele pode ser o filamento de não-codificação, também referido como o filamento antissense como descrito também abaixo.

O polinucleotídeo adequado para uso no método descrito pode compreender nucleotídeos, ou ácidos nucleicos de ribonucleotídeos, deoxiribonucleotídeos ou peptídeo (PNAs), que compreendem bases de purina e pirimidina, ou outras bases de nucleotídeo naturais, quimicamente ou bioquimicamente modificadas, não-naturais, ou derivatizadas. A cadeia principal do polinucleotídeo pode compreender grupos de açúcar e fosfato, como podem tipicamente ser encontrados em RNA ou DNA, ou grupos de açúcar ou fosfato modificados ou substituídos. O polinucleotídeo pode também compreender nucleotídeos modificados, tais como nucleotídeos e análogos de nucleotídeo metilados. A sequência de nucleotídeos pode ser interrompida por componentes de não-nucleotídeo. Desse modo, os termos nucleosídeo, nucleotídeo, deoxinucleosídeo e deoxinucleotídeo geralmente incluem análogos tendo alguns aspectos estruturais em comum com um nucleosídeo ou nucleotídeo de ocorrência natural tal que quando incorporados em uma sequência de polinucleotídeo, eles permitem a hibridização com uma sequência de polinucleotídeo de ocorrência natural em solução. Tipicamente, estes análogos são derivados de nucleosídeos e nucleotídeos de ocorrência natural substituindo e/ou modificando a porção de base, a ribose ou o fosfodiéster. As mudanças podem ser ajustadas para estabilizar ou desestabilizar a formação de híbrido ou realçar a especificidade de hibridização com uma

sequência de polinucleotídeo de complementaridade.

O polinucleotídeo da invenção também inclui em seu escopo uma variante ou fragmento da sequência de polinucleotídeo, em que o referido variante ou fragmento codifica um polipeptídeo tendo uma atividade biológica que seja funcionalmente a mesma como o polipeptídeo (ou fragmento deste) codificado pelo polinucleotídeo da invenção, em particular a sequência de polinucleotídeo definida na SEQ ID NO: 2 em que a referida variante pode estar localizada e isolada usando técnicas padrão em biologia molecular, sem teste e experimentação indevida.

O grau de homologia entre duas sequências de polinucleotídeo pode ser determinado por meios de programas de computador conhecidos na técnica tais como intervalo fornecido no pacote de programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Versão 8, Agosto de 1996, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. e Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453) usando, por exemplo, os parâmetros básicos de penalidade de criação de intervalo de 5 e penalidade de largura de intervalo de 0,3. Os homólogos de moléculas de polinucleotídeo são moléculas de polinucleotídeo que codificam os polipeptídeos que têm substancialmente as mesmas funções e propriedades similares em diferentes espécies, em que os polipeptídeos codificados podem compartilhar, em pelo menos regiões, pelo menos 50% de identidade de aminoácido, e sobre as sequências de aminoácido completas codificadas, pelo menos cerca de 30% de identidade de aminoácido, pelo menos cerca de 40% de identidade de aminoácido, pelo menos cerca de 50% de identidade de aminoácido, pelo menos cerca de 60% de identidade de aminoácido, pelo menos cerca de 70% de identidade de aminoácido, pelo menos cerca de 80% de identidade de aminoácido, pelo menos cerca de 90% de identidade de aminoácido ou pelo menos cerca de 95% de identidade. Os níveis exemplares de identidade de sequência do polipeptídeo HOG1 (SEQ ID NO: 1) com seu homólogo em arroz (SEQ ID NO: 5), trigo (SEQ ID NO: 7), crisântemo (SEQ ID NO: 9) e *Petunia hybrida* (SEQ ID NO: 13) foram descritas acima. Os homólogos de polinucleotídeo correspondentes po-

dem compartilhar significativamente menos do que 50% de identidade devido à degeneração no código genético, e diferenças no uso de código preferido entre diferentes gêneros e espécies de planta. Por exemplo, usando CLUSTAL W (1,83), o polinucleotídeo codificando o polipeptídeo HOG1 (SEQ ID NO: 1) da invenção foi mostrado ter 82% de identidade de sequência com seu homólogo em arroz (SEQ ID NO: 6), 83% de identidade de sequência com seu homólogo em trigo (SEQ ID NO: 8), 82% de identidade de sequência com seu homólogo em crisântemo (SEQ ID NO: 10), 78% de identidade de sequência com seu homólogo em *Petunia hybrida* (SEQ ID NO: 14), 98% de identidade de sequência com seu homólogo em *Brassica alboglabra* (SEQ ID NO: 12), 79% de identidade de sequência com seu homólogo em *Lycopersicon esculentum* (SEQ ID NO: 28), 80% de identidade de sequência com seu homólogo em *Solanum tuberculoosum* (SEQ ID NO: 30) e 78% de identidade de sequência com o polinucleotídeo codificando o polipeptídeo SAHH1 de *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi* (SEQ ID NO: 4).

A molécula de polinucleotídeo pode também incluir em seu escopo uma variante capaz de hibridizar para as moléculas de polinucleotídeo da invenção, em particular, as sequências de polinucleotídeos definidas nas SEQ ID NOS: 4, 6, 8, 10, 12, 14, e 15 sob condições de rigorosidade baixa, mais preferivelmente, rigorosidade média e ainda mais preferivelmente, rigorosidade alta. As condições de hibridização de rigorosidade baixa podem corresponder à hibridização realizada a 50°C em 2 x SSC.

As condições experimentais adequadas para determinar se uma determinada molécula de polinucleotídeo hibridiza para um polinucleotídeo especificado podem envolver a pré-imersão de um filtro contendo uma amostra relevante do polinucleotídeo a ser examinado em 5 x SSC durante 10 min, e pré-hibridização do filtro em uma solução de 5 x SSC, 5 x solução de Denhardt's, 0,5% de SDS e 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão sonificado desnaturado, seguido por hibridização na mesma solução contendo uma concentração de 10 ng/ml de uma sonda rotulada por ³²P-dCTP durante 12 horas em aproximadamente 45°C, de acordo com os métodos de hibridização como descrito em Sambrook e outros (1989; Molecular Cloning, A La-

boratory Manual, 2ª edição, Cold Spring Harbour, Nova Iorque).

O filtro é então lavado duas vezes durante 30 minutos em 2 x SSC, 0,5% de SDS pelo menos 55°C (rigoridade baixa), pelo menos 60°C (rigoridade média), pelo menos 65°C (rigoridade média/alta), pelo me-
5 nos 70°C (rigoridade alta), ou pelo menos 75°C (rigoridade muito alta). A hibridização pode ser detectada por exposição do filtro a uma película de raios X.

Além disso, existem numerosas condições e fatores, bem-
conhecidos por aqueles versados na técnica, que podem ser empregados
10 para alterar a rigoridade de hibridização. Por exemplo, o comprimento e natureza (DNA, RNA, composição de base) do polinucleotídeo a ser hibridi-
zado para um polinucleotídeo especificado; concentração de sais e outros componentes, tais como a presença ou ausência de formamida, sulfato de dextrano, polietileno glicol etc; e alterar a temperatura da hibridização e/ou
15 etapas de lavagem.

Além disso, é também possível teoricamente prever se ou não
duas determinadas sequências de polinucleotídeo hibridizarão sob certas
condições especificadas. Consequentemente, como uma alternativa para o
método empírico descrito acima, a determinação quanto a se uma sequência
20 de polinucleotídeo variante hibridizará para a molécula de polinucleotídeo
definida de acordo com o segundo ou terceiro aspecto, ou mais especifica-
mente, o polinucleotídeo de SEQ ID NO: 2 ou 15 pode ser com base em um
cálculo teórico do T_m (temperatura de fusão) em que duas sequências de
polinucleotídeo heterólogas com sequências conhecidas hibridizarão sob
25 condições especificadas, tais como temperatura e concentração de sal.

Ao determinar a temperatura de fusão para sequências de poli-
nucleotídeo heterólogas ($T_{m(\text{hetero})}$) é necessário primeiro determinar a tempe-
ratura de fusão ($T_{m(\text{homo})}$) para sequências de polinucleotídeo homólogas. A
temperatura de fusão ($T_{m(\text{homo})}$) entre dois filamentos de polinucleotídeo
30 completamente complementar (formação homoduplex) pode ser determina-
da de acordo com a seguinte fórmula, como descrito em Current Protocols in
Molecular Biology, John Wiley and Sons, 1995, como:

$$T_{m(\text{homo})} = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6(\log M) + 0,41(\% \text{ de GC}) - 0,61 (\% \text{ de forma}) - 500/L$$

M = significa a molaridade de cátions monovalentes,

% de GC = % de guanina (G) e citosina (C) de número total de bases na sequência,

5 % de forma = % de formamida no tampão de hibridização, e
L = o comprimento da sequência de polinucleotídeo.

T_m determinado pela fórmula acima é o T_m de uma formação homoduplex ($T_{m(\text{homo})}$) entre dois polinucleotídeos de sequência completamente complementar. Para adaptar o valor de T_m àquele de duas sequências de polinucleotídeos heterólogos, é suposto que uma diferença de 1% em sequência de nucleotídeo entre duas sequências heterólogas se iguale a diminuição de 1°C em T_m . Portanto, o $T_{m(\text{hetero})}$ para a formação de heteroduplex é obtido por subtração do % de diferença de homologia entre as sequências análogas em questão e a sonda de nucleotídeo descrita acima do

10

15 $T_{m(\text{homo})}$.

Tipicamente, a molécula de polinucleotídeo definida na SEQ ID NO: 2 ou 15 também inclui em seu escopo uma molécula de polinucleotídeo que é um fragmento de oligonucleotídeo do mesmo. Tipicamente, o fragmento de oligonucleotídeo é entre cerca de 15 a cerca de 1775 nucleotídeos em comprimento. Mais tipicamente, o fragmento de oligonucleotídeo é entre cerca de 15 a cerca de 1200 nucleotídeos em comprimento. Ainda mais tipicamente, o fragmento de oligonucleotídeo é entre cerca de 15 a cerca de 700 nucleotídeos em comprimento. Ainda mais tipicamente, o fragmento de oligonucleotídeo é entre cerca de 15 a cerca de 200 nucleotídeos em comprimento. Contudo, ainda mais tipicamente, o fragmento de oligonucleotídeo é entre cerca de 15 a cerca de 75 nucleotídeos em comprimento.

20

25

Tipicamente, o fragmento de oligonucleotídeo é entre cerca de 15 a cerca de 1775 de nucleotídeos em comprimento. Mais tipicamente, o fragmento de oligonucleotídeo é entre cerca de 100 a cerca de 1775 nucleotídeos em comprimento. Ainda mais tipicamente, o fragmento de oligonucleotídeo é entre cerca de 500 a cerca de 1775 nucleotídeos em comprimento. Ainda mais tipicamente, o fragmento de oligonucleotídeo é entre cerca de

30

1000 a cerca de 1775 nucleotídeos em comprimento. Contudo, ainda mais tipicamente, o fragmento de oligonucleotídeo é entre cerca de 1200 a cerca de 1775 nucleotídeos em comprimento.

O termo "complementar" se refere à hibridização ou pareamento de base entre nucleotídeos ou ácido nucleicos, tal como, por exemplo, entre os dois filamentos de uma molécula de DNA de filamento duplo ou entre um iniciador de oligonucleotídeo e um sítio de ligação de iniciador em um ácido nucleico de filamento único a ser sequenciado ou amplificado. Os nucleotídeos complementares são, geralmente, A e T (ou A e U), ou C e G. Duas moléculas de RNA ou DNA de filamento único são referidas serem complementares quando os nucleotídeos de um filamento, de modo mais eficiente alinhados e comparados e com inserções ou deleções de nucleotídeo apropriadas, se emparelham com pelo menos cerca de 80% dos nucleotídeos do outro filamento, geralmente pelo menos cerca de 90% a 95%, e mais preferivelmente de cerca de 98 a 100% dos nucleotídeos do outro filamento. Alternativamente, a complementaridade existe quando um filamento de RNA ou DNA hibridiza sob condições de hibridização seletiva para seu complemento. Tipicamente, a hibridização seletiva ocorrerá quando houver pelo menos cerca de 65% de complementaridade em um amido de pelo menos 14 a 25 nucleotídeos, preferivelmente pelo menos cerca de 75%, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% de complementaridade.

O polipeptídeo e moléculas de polinucleotídeo da presente invenção são "isolados". O termo "isolado" como aqui usado refere-se à substância que é substancialmente ou essencialmente livre de componentes que normalmente o acompanham em seu estado nativo. Por exemplo, um "polinucleotídeo isolado", como usado aqui, se refere a um polinucleotídeo, que foi purificado das sequências que o flanqueiam em um estado de ocorrência natural. A substância "isolada" está ou presente em uma preparação em uma concentração mais elevada do que a substância encontrada por natureza ou em seu estado de ocorrência natural ou que a substância está presente em uma preparação que contém outros materiais com os quais as substâncias não estão associadas por natureza.

Em certas modalidades, o polipeptídeo e moléculas de polinucleotídeo da presente invenção são moléculas exógenas. O termo "exógeno" quando usado com referência a um polinucleotídeo ou molécula de polipeptídeo significa que o polinucleotídeo ou polipeptídeo é isolado e/ou derivado da espécie exceto as espécies de célula-alvo, em que o polinucleotídeo ou polipeptídeo deve ser introduzido.

Em uma modalidade, um polinucleotídeo que reduz a expressão do polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO: 1 é introduzido na planta de interesse. O polinucleotídeo pode ser um polinucleotídeo inibidor, por exemplo, um polinucleotídeo de antissense (tal como, RNA de antissense), um constructo de interferência de RNA (tal como siRNA) e um constructo de ácido nucleico de antissense catalítico (tal como a ribozima). O polinucleotídeo pode ser preparado usando métodos conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, por síntese química, procedimentos de DNA recombinante ou, no caso de RNA de antissense, por transcrição *in vitro* ou *in vivo* quando ligado a um promotor.

Em certas modalidades, o polinucleotídeo é um polinucleotídeo de antissense. Um "polinucleotídeo de antissense" é uma sequência de polinucleotídeo que é complementar a, e pode, portanto, hibridizar com qualquer uma ou todas das sequências de codificação da presente invenção, incluindo sequências parciais da mesma.

As moléculas de antissense de tamanho natural podem ser usadas para este propósito. Alternativamente, os oligonucleotídeos de filamento duplo, de sentido e/ou antissense, ou uma combinação dos mesmos direcionados para regiões específicas do RNA codificado por HOG1 podem ser utilizados. O uso de moléculas de oligonucleotídeo para diminuir os níveis de expressão de um gene predeterminado é conhecido na técnica (veja, por exemplo, Hamilton, A.J. and Baulcombe, D. C. (1999), "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants", *Science* 286:950-952; Waterhouse P.M. e outros (1998) , "Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13959- 13964; e Publicações

de Patente Internacional WO 99/53050, WO 99/49029, WO 99/32619). As moléculas de oligonucleotídeo podem ser fornecidas *in situ* transformando-se células de planta com um constructo de DNA que, sob transcrição, produz sequências de RNA de filamento duplo e/ou antissense, que podem ser se-

5 sequências de tamanho natural ou parciais. O efeito de silenciamento de gene pode ser realçado por superprodução de ambas sequências de senso e/ou antissense (que podem ser de tamanho natural ou parciais) de modo que uma quantidade elevada de RNA de filamento duplo seja produzida.

Como descrito acima, as sequências de constructos de antis-

10 sense podem ser derivadas de várias regiões do gene HOG1. Por exemplo, uma sequência de antissense pode compreender pelo menos 15, pelo menos 20, ou pelo menos 25 resíduos de ácido nucleico contíguos de um polinucleotídeo sendo complementar a uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido

15 com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1. A sequência de antissense pode compreender cerca de 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 ou 850 resíduos de ácido nucleico contíguos. Qualquer sequência contígua compreendendo o número desejado de resí-

20 duos pode ser usada. As sequências contíguas podem ser designadas usando qualquer método e algoritmo conhecido na técnica. Como um exemplo, onde os polinucleotídeos de antissense compreendendo 15 resíduos de ácido nucleico contíguos são desejados, um primeiro polinucleotídeo pode compreender 15 resíduos de ácido nucleico contíguos iniciando na posição

25 301 de um sequência de polinucleotídeo e terminando na posição 315 da sequência de polinucleotídeo, um segundo polinucleotídeo pode compreender 15 resíduos de ácido nucleico contíguos iniciando na posição 302 de um sequência de polinucleotídeo e terminando na posição 316 da sequência de polinucleotídeo, um terceiro polinucleotídeo pode compreender 15 resíduos

30 de ácido nucleico contíguos iniciando na posição 303 de um sequência de polinucleotídeo e terminando na posição 317 da sequência de polinucleotídeo, e um quarto polinucleotídeo pode compreender 15 resíduos de ácido

nucleico contíguos iniciando na posição 304 de um sequência de polinucleotídeo e terminando na posição 318 do sequência de polinucleotídeo. Os polinucleotídeos adicionais compreendendo 15 resíduos de ácido nucleico contíguos podem ser obtidos sequencialmente identificando-se estiramentos de

5 15 resíduos de ácido nucleico contíguo ao longo de uma cadeia de polinucleotídeo. Seria óbvio para uma pessoa versada na técnica que sequências contíguas de outros comprimentos pudessem ser preparadas usando uma estratégia similar.

Em uma modalidade, um primeiro polinucleotídeo de antissense

10 compreendendo 15 resíduos de ácido nucleico contíguos iniciando na posição 271 e terminando na posição 286 da sequência de polinucleotídeo de SEQ ID NO: 2 tem a seguinte sequência de ácido nucleico: CTC GGC GCG GAA GTC (SEQ ID NO: 16). Ao usar a estratégia descrita acima, um segundo polinucleotídeo de antissense compreendendo 15 resíduos de ácido nu-

15 cleico contíguos iniciando na posição 272 e terminando na posição 287 da sequência de polinucleotídeo de SEQ ID NO: 2 tem a seguinte sequência de ácido nucleico: TCG GCG CGG AAG TCA (SEQ ID NO: 17). Terceiro e quarto polinucleotídeos de antissense têm as seguintes sequências de ácido nucleico, respectivamente: CGG CGC GGA AGT CAG (SEQ ID NO: 18) e GGC

20 GCG GAA GTC AGA (SEQ ID NO: 19). Os polinucleotídeos de antissense adicionais compreendendo 15 resíduos de ácido nucleico contíguos podem ser obtidos como descrito acima.

Em certas modalidades, o polinucleotídeo de antissense compreende 15 resíduos de ácido nucleico contíguo. Em modalidades particula-

25 res, o polinucleotídeo antissense compreende pelo menos 100 resíduos de ácido nucleico contíguos.

Os constructos de antissense podem ser designadas para direcionar e se ligar às regiões reguladoras da sequência de nucleotídeo, tais como o promotor, ou às sequências de codificação (exon) ou não-

30 codificação (intron). Em uma modalidade, os polinucleotídeos de antissense direcionados na SEQ ID NO: 2 são usados, o que resulta na expressão diminuída do polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO: 1. Em uma modalida-

de, os polinucleotídeos de antissense de acordo com a SEQ ID NO: 15 (um fragmento de 850 bp de SEQ ID NO: 2 abrangendo dois domínios de assinatura de SAHH) são usados. Os constructos de antissense da invenção podem ser geradas as quais sejam pelo menos substancialmente complementares através de seu comprimento à região do gene HOG1 em questão (SEQ ID NO: 2). A ligação de um constructo de antissense à sua sequência celular complementar pode interferir com a transcrição, processamento de RNA, transporte, translação e/ou estabilidade de mRNA. Os polinucleotídeos de antissense adequados podem ser preparados por métodos bem-conhecidos por aqueles versados na técnica. Tipicamente, os polinucleotídeos de antissense serão sintetizados em sintetizadores automáticos. Os polinucleotídeos de antissense adequados podem incluir modificações designadas para melhorar sua liberação nas células, sua estabilidade uma vez dentro de uma célula, e/ou sua ligação a um alvo apropriado. Por exemplo, o polinucleotídeo de antissense pode ser modificado pela adição de uma ou mais ligações de fosforotioato, ou a inclusão de um ou mais anéis de morfolina na cadeia principal.

Alternativamente, os constructos de RNAi podem ser usados para diminuir a expressão dos polinucleotídeos codificando o polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 1 de acordo com métodos conhecidos na técnica (por exemplo, Fire e outros (1998) *Nature* 391: 806-811; Hammond, e outros (2001) *Nature Rev, Genet.* 2: 110-1119; Hammond e outros (2000) *Nature* 404: 293-296; Bernstein e outros (2001) *Nature* 409: 363-366; Elbashir e outros (2001) *Nature* 411: 494-498; WO 99/49029 e WO 01/70949, as descrições das quais estão incorporadas aqui por referência). RNAi se refere a um meio de silenciamento de gene pós-transcricional seletivo por destruição de mRNA específico por moléculas de RNA interferentes pequenas (siRNA). O siRNA é tipicamente gerado pela clivagem de RNA de filamento duplo, onde um filamento é idêntico à mensagem a ser inativada. As moléculas de RNA de filamento duplo podem ser sintetizadas nas quais um filamento é idêntico a uma região específica da transcrição de mRNA e introduzida diretamente. Alternativamente, o DNA de filamento duplo correspondente

pode ser empregado, o qual, uma vez apresentado intracelularmente é convertido em RNA de filamento duplo. Os métodos para a síntese de moléculas de siRNA adequadas para uso em RNAi e para obter silenciamento de gene pós-transcricional são conhecidos por aqueles versados na técnica. O destinatário versado apreciará que uma faixa de construções de siRNA adequada capaz de diminuir a expressão do polinucleotídeo compreendendo SEQ ID NO: 2 pode ser identificada e gerada com base no conhecimento da sequência do gene em questão usando procedimentos de rotina conhecidos por aqueles versados na técnica sem experimentação indevida.

Aqueles versados na técnica também apreciarão que não há necessidade de haver necessariamente 100% de pareamento de sequência de nucleotídeo entre a sequência-alvo e a sequência de siRNA. A capacidade de má combinação é amplamente dependente do local da má combinação nas sequências. Em alguns casos, as más combinações de 2 ou 3 nucleotídeos podem ser aceitáveis, porém em outros casos uma única má combinação de nucleotídeo é o bastante para negar a eficácia do siRNA. A adequabilidade de uma molécula de siRNA particular pode ser determinada usando procedimentos de rotina conhecidos por aqueles versados na técnica sem experimentação indevida. Por exemplo, um polinucleotídeo de interferência de RNA que compreende uma sequência de ácido nucleico compreendendo pelo menos 9 resíduos de ácido nucleico contíguos selecionados da sequência de ácido nucleico que é complementar a um polinucleotídeo consistindo na sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 2 pode ser usado. Em algumas modalidades, os polinucleotídeos de interferência de RNA que compreendem uma sequência de ácido nucleico compreendendo cerca de 9, 10, 11, ou 12 resíduos de ácido nucleico contíguos, podem ser usados. Qualquer sequência contígua compreendendo o número de resíduos desejado pode ser usada. As sequências contíguas podem ser designadas usando qualquer método e algoritmo conhecido na técnica. Como um exemplo, onde os polinucleotídeos de interferência de RNA compreendendo 9 resíduos de ácido nucleico contíguos são desejados, um primeiro polinucleotídeo pode compreender 9 resíduos de ácido nucleico

contíguos iniciando na posição 61 de uma sequência de polinucleotídeo e terminando na posição 69 da sequência de polinucleotídeo, um segundo polinucleotídeo pode compreender 9 resíduos de ácido nucleico contíguos iniciando na posição 62 de uma sequência de polinucleotídeo e terminando na
 5 posição 70 da sequência de polinucleotídeo, um terceiro polinucleotídeo pode compreender 9 resíduos de ácido nucleico contíguos iniciando na posição 63 de uma sequência de polinucleotídeo e terminando na posição 71 da sequência de polinucleotídeo, e um quarto polinucleotídeo pode compreender 9 resíduos de ácido nucleico contíguos iniciando na posição 64 de uma
 10 sequência de polinucleotídeo e terminando na posição 72 da sequência de polinucleotídeo. Os polinucleotídeos adicionais compreendendo 9 resíduos de ácido nucleico contíguos podem ser obtidos sequencialmente identificando-se como estiramentos de 9 resíduos de ácido nucleico contíguos ao longo da cadeia de polinucleotídeo. Seria óbvio para uma pessoa versada na técnica
 15 que as sequências contíguas de outros comprimentos possam ser preparadas usando uma estratégia similar.

Em uma modalidade, o primeiro polinucleotídeo de interferência de RNA compreendendo 9 resíduos de ácido nucleico contíguos iniciando na posição 42 e terminando na posição 50 da sequência de polinucleotídeo de
 20 SEQ ID NO: 2 tem a seguinte sequência: AGA TCC GAA (SEQ ID NO: 20). Ao usar a estratégia descrita acima, um segundo polinucleotídeo de interferência de RNA compreendendo 9 resíduos de ácido nucleico contíguos iniciando na posição 43 e terminando na posição 51 da sequência de polinucleotídeo de SEQ ID NO: 2 tem a seguinte sequência: GAT CCG AAA (SEQ ID
 25 NO: 21). O terceiro e quarto polinucleotídeo de interferência de RNA têm as seguintes sequências, respectivamente: ATC CGA AAA (SEQ ID NO: 22) e TCC GAA AAA (SEQ ID NO: 23). Os polinucleotídeos de interferência de RNA adicionais compreendendo 9 resíduos de ácido nucleico contíguos podem ser obtidos como descrito acima. Informações adicionais sobre o planejamento e uso de siRNA também podem ser encontradas em "The siRNA
 30 User Guide," disponibilizado em www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/10-0/105/sirna.html.

Outro meio de diminuir uma expressão dos polinucleotídeos codificando o polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 1 pode ser obtido introduzindo-se constructos de ácido nucleico de antissense catalíticos, tais como ribozimas, que são capazes de clivar as transcrições de RNA e, desse modo, prevenir a produção de proteína do tipo selvagem. As ribozimas são direcionadas e anelam-se com uma sequência particular em virtude de duas regiões de complementaridade de sequência com o alvo flanqueando o sítio catalítico de ribozima. Após a ligação, a ribozima cliva o alvo de uma maneira específica do sítio. O planejamento e teste de ribozimas que especificamente reconhecem e clivam as sequências de interesse pode ser obtido por técnicas bem-conhecidas por aqueles na técnica (por exemplo, Lieber and Strauss, (1995) Mol. Cell. Biol. 15:540-551, a descrição do qual está incorporada aqui por referência).

Em certas modalidades, a diminuição em uma expressão do polinucleotídeo codificando o polipeptídeo compreendendo SEQ ID NO: 1 é o resultado da cossupressão. A cossupressão se refere à inibição de um gene endógeno causada pela introdução de um transgene. Tipicamente, a cossupressão é observada em plantas transgênicas que foram transformadas com uma ou mais cópias de uma construção de gene que são idênticas a ou compartilham homologia de sequência de nucleotídeo com um gene endógeno. Em algumas destas plantas transformadas, a supressão pode ocorrer para ambos o transgene introduzido bem como o homólogo endógeno, por exemplo, como um resultado da produção fortuita de RNA de antissense, ou devido às interações cromossômicas anômalas entre o transgene introduzido e o homólogo endógeno (*Hooper, The petunia paradox: added copies of genes have puzzling effects in plants*, J. NIH Res- 3:49-54, (1991). Em consequência, ao invés de resultar em um nível aumentado de expressão do transgene introduzido, a cossupressão leva a uma diminuição no nível de expressão do polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO: 1.

Como descrito no Exemplo 2, Figuras 9c, 11a, 11b, 11d, e 11g, e Tabela 8 abaixo, algumas das plantas de arroz transgênicas transformadas com os constructos de superexpressão exibiram características que foram

vistas em plantas transformadas com construções de antissense como um resultado de cossupressão. Por exemplo, estas plantas de cossupressão exibiram ramificação dos nodos acima do solo dos cultivos principais (que levam a um aumento total significativo no número de panículas por planta), e
5 aumentam de 2 a mais de 3 vezes no número médio de sementes e biomassa da planta quando comparado ao WT.

Os polinucleotídeos que introduzem uma mutação compreendendo inserções, deleções ou substituições de nucleotídeo únicas ou múltiplas para diminuir uma expressão do polipeptídeo de acordo com a SEQ ID
10 NO: 1 são também contempladas. As inserções, deleções ou substituições únicas ou múltiplas de nucleotídeo podem ser introduzidas através de recombinação do sítio de mutação alvo com uma sequência de nucleotídeo de direcionamento introduzida. Tal sequência de nucleotídeo introduzida pode, por exemplo, compreender uma sequência de nucleotídeo a ser introduzido
15 no genoma flanqueado em cada lado por sequências de nucleotídeo homólogas às sequências-alvo contíguo em ou localizadas em qualquer lado de um ponto de inserção de mutação desejado. As sequências de nucleotídeo homólogas às sequências-alvo podem ser isogênicas com as sequências-alvo para de esse modo promover a frequência de recombinação homóloga.

20 As sequências de nucleotídeo homólogas que não são estritamente isogênicas às sequências-alvo podem também ser usadas. Embora a má combinação entre as sequências de nucleotídeo homólogas e as sequências-alvo possa adversamente afetar a frequência de recombinação homóloga, a isogenicidade não é estritamente requerida e homologia substancial pode ser suficiente. Para os propósitos da presente invenção, o nível
25 de homologia entre as sequências homólogas e as sequências-alvo pode ser pelo menos cerca de 90% de identidade, pelo menos cerca de 95% de identidade, pelo menos cerca de 99% de identidade ou 100% de identidade.

30 As mutações podem ser introduzidas por técnicas mutagênicas químicas ou físicas, ou usando meios de mutação insercionais tais como transposons ou T-DNA, e ácido nucleico exógeno podem ser introduzidos por meios recombinantes empregando, por exemplo, permeação de célula

auxiliada por substância química (usando, por exemplo, cálcio, lítio, PEG), eletroporação, microinjeção, transfecção mediada por lipossoma, bombardeio de micropartícula (biolísticas), transformação mediada por *Agrobacterium*, infecção de vírus, fusão de protoplasto ou qualquer outro meio apropriado como são conhecidos na técnica.

A diminuição ou aumento em uma expressão dos polinucleotídeos codificando o polipeptídeo de acordo com a SEQ ID NO: 1 pode ser estável ou transitório (por exemplo, somente em estágios de desenvolvimento específico ou tecido em uma ou duas gerações), dependendo se a planta foi estavelmente ou transitoriamente transformada. "Estavelmente transformada" se refere à introdução e integração de um ou mais transgenes no genoma de uma célula. A transformação estável de uma célula pode ser detectada por técnicas que são conhecidas na técnica, por exemplo, por hibridização de mancha de DNA genômico da célula com sequências de ácido nucleico que sejam capazes de se ligar a um ou mais dos transgenes, ou pela reação em cadeia de polimerase de DNA genômico da célula para amplificar as sequências de transgene.

Ao contrário, o termo "transitoriamente transformado" se refere à introdução de um ou mais transgenes em uma célula onde o transgene não integra no genoma da célula transformada. A transformação transitória pode ser detectada, por exemplo, detectando-se a presença de um polipeptídeo codificado por um ou mais dos transgenes usando ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) ou por detecção da atividade da proteína (por exemplo, β -glucuronidase) codificada pelo transgene. Desse modo, um transformante estável é distinguido do transformante transitório pelo fato de que, considerando que o DNA genômico do transformante estável contém um ou mais transgenes, o DNA genômico do transformante transitório não contém um transgene.

Os polinucleotídeos da invenção podem ser administrados na forma de um plasmídeo de DNA nu ou em um vetor. Os plasmídeos de DNA nu podem ser introduzidos nas células hospedeiras por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, transfecção, eletroporação, microinjeção, transdu-

ção, fusão de célula, dextrano de DEAE, precipitação de fosfato de cálcio, uso de uma pistola de gene, ou uso de um transportador de vetor de DNA.

Em algumas modalidades preferidas, os polinucleotídeos da invenção podem ser administrados em um vetor. O vetor pode ser um vetor de plasmídeo, um vetor viral, ou qualquer outro veículo adequado (tal como cosmídeos) adaptado para a inserção de sequências estrangeiras e introdução em células eucarióticas. Em certas modalidades, o vetor é um vetor de expressão capaz de direcionar a transcrição da sequência de DNA de uma molécula de polinucleotídeo inibidora da invenção no RNA. Os vetores de expressão virais incluem, por exemplo, vetores com base em vírus epstein-barr, vírus do papiloma bovino, adenovírus e vírus adeno-associado. Em uma modalidade, o vetor é epissômico. O uso de um vetor epissômico adequado fornece um meio de manter a molécula de ácido nucleico inibidora em células alvo em número de cópia elevado extra-cromossomicamente desse modo eliminando os efeitos potenciais de integração cromossômica.

Os vetores podem também compreender ácidos nucleicos incluindo expressão de elementos de controle, tais como sinais de controle de transcrição/translação, origens de replicação, sinais de poliadenilação, sítios de entrada de ribossoma internos, promotores, realçadores, etc., em que os elementos de controle são operativamente associados com um ácido nucleico codificando um produto de gene. Por exemplo, a ligação operativa de uma região de codificação a um promotor permite a transcrição da região de codificação do promotor por um RNA polimerase que especificamente reconhece, se liga a e transcreve a região de codificação. Em certas modalidades, a região de codificação é colocada sob um promotor constitutivo poderoso, tal como o promotor de vírus mosaico da couve-flor (CaMV) 35S ou o promotor do vírus mosaico de figueira 35S. Outros promotores constitutivos contemplados para uso na presente invenção incluem, porém não estão limitados a: promotores de T-DNA manopina sintetase, nopalina sintase (NOS) e octopina sintase (OCS).

Alternativamente, os promotores induzíveis tais como promotores induzíveis por tensão (por exemplo, promotores de luz elevada, secura,

salinidade ou induzidos por temperatura) podem ser usados. Os promotores induzíveis exemplares incluem os promotores de gene de subunidade pequenos de ribulose biscofosfato carboxilase (RuBisCo) ou promotores de gene de clorofila a/b proteína de ligação (CAB) para expressão em tecido fotossintético, vários promotores gene de proteína de armazenamento de semente para expressão em sementes, e promotores de gene de glutamina sintetase específica de raiz para expressão no sistema de raiz da planta transformada.

O vetor pode ser um vetor binário. Por exemplo, um sistema de vetor binário de *Agrobacterium* pode ser usado, que compreende a região de codificação selecionada sob controle de um promotor constitutivo ou induzível como descrito acima, e ligado a um marcador de resistência de fármaco nuclear, tal como resistência a canamicina. Outros sistemas de marcador selecionáveis úteis incluem, porém não estão limitados a: outros genes que conferem resistências ao antibiótico (por exemplo, resistência à higromicina ou bialafos) ou resistência à herbicida (por exemplo, resistência à sulfonilureia, fosfinotricina, ou glifosato). Os vetores binários comumente usados incluem pBIN19, pPVP e pGreen.

Em algumas modalidades, pode também ser útil remover, adicionar ou alterar as porções não-transladadas 5' dos clones para eliminar códon de iniciação de translação alternativa potencialmente inapropriada extra, (isto é, início) ou outras sequências que podem interferir com ou reduzir a expressão, no nível de transcrição ou translação. Alternativamente, os sítios de ligação de ribossoma de consenso (veja, por exemplo, Kozak, J Biol. Chem., 266:19867- 19870 (1991)) podem ser inseridos imediatamente a 5' do códon inicial para realçar a expressão. O desejo de (ou necessidade de) tal modificação pode ser empiricamente determinado, e a seleção destes e outros elementos de vetor comuns, são convencionais. Muitas tais sequências também podem ser derivadas de vetores comercialmente disponíveis. (Veja, por exemplo, Sambrook, J. e outros, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Sambrook, J. e Russell, D.W. (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, e referências citadas aqui e Ausubel e outros (eds) Current Pro-

tocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (2000)).

O vetor da invenção pode ser introduzido em células alvo usando qualquer método adequado conhecido na técnica para introduzir DNA em células, incluindo, porém não limitado a microinjeção, eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio, liberação mediada por lipossoma, infecção viral, fusão de protoplasto, e absorção mediada por partícula. Opcionalmente, um polinucleotídeo da invenção é coadministrado com uma recombinase, por exemplo, recA, a uma célula-alvo para desse modo realçar a taxa de recombinação homóloga. A(s) célula(s)-alvo pode(m) já compreender, ou ter(em) sido transformada(s) para compreender sequências-alvo de recombinase adequadas, se requerido. Por exemplo, proteína(s) recombinase pode(m) ser carregada(s) sobre um DNA de direcionamento como descrito na Pat U.S. Nº 6.255.113. Para realçar o processo de carregamento, um polinucleotídeo da invenção pode conter uma ou mais sequências de nucleação recombino-
gênicas, ou ser revestida com uma proteína recombinase por pré-incubação do polinucleotídeo com uma recombinase, por meio do que a recombinase é não covalentemente ligada ao polinucleotídeo (Veja, por exemplo, A. Vergunst e outros (1998), Nucleic Acids Res. 26:2729 e A. Vergunst e P. Hooykaas (1998), Plant Molec. Biol. 38:393 406, Publicações de Patente Internacionais WO 99/25821, WO 99/25840, WO 99/25855, e WO 99/25854 e Pat. U.S. Nºs 5.780.296, 6.255.113, e 6.686.515).

As plantas transgênicas com um dos polinucleotídeos da invenção podem ser geradas usando métodos de transformação de planta conhecidos por aqueles versados na técnica incluindo, porém não limitado a, transformação mediada por *Agrobacterium*, tratamento de cátion ou polietileno glicol de protoplastos, eletroporação, bombardeio de micropartícula, agitação de suspensões de célula em solução com microcontas ou micropartículas revestidas com o DNA de transformação, absorção de DNA direta, absorção de DNA mediada por lipossoma, e similar, com também descrito em uma ampla faixa de textos publicamente disponíveis, tal como: Methods for Plant Molecular Biology" (Weissbach & Weissbach, eds., 1988); Clough, S.J. e Bent, A. F. (1998) "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-

mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*" Plant J. 16, 735-743; "Methods in Plant Molecular Biology" (Schuler & Zielinski, eds., 1989); "Plant Molecular Biology Manual" (Gelvin, Schilperoort, Verma, eds., 1993); e "Methods in Plant Molecular Biology-A Laboratory Manual" (Maliga, Klessig, Cashmore, Gruissem & Varner, eds., 1994). Veja também Sambrook, J. e outros, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Sambrook, J. e Russell, D.W. (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, e referências citadas aqui e Ausubel e outros (eds) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (2000), estas referências sendo incorporadas aqui por referência cruzada.

O método preferido de transformação pode depender da planta a ser transformada. Os vetores de *Agrobacterium* são geralmente usados para transformar as espécies dicotiledôneas. Para transformação de espécies monocotiledôneas, o bombardeio biolístico com partículas revestidas com DNA de transformação e fibras de silício revestidas com DNA de transformação são geralmente úteis para transformação nuclear. Entretanto, a transformação mediada por *Agrobacterium* de espécies monocotiledôneas, incluindo trigo, são agora conhecidas (veja, por exemplo, Publicações de Patente Internacionais WO 97/48814; veja também Hiei, Y. e outros (1994), Plant J. 6(2):271-282 e Publicação de patente Internacional WO 92/06205).

Qualquer célula de planta pode ser transformada usando os métodos e materiais da presente invenção para produzir plantas geneticamente modificadas, células de planta, tecido de planta, semente, e similar. As células de planta que foram transformadas podem ser desenvolvidas em plantas de acordo com métodos convencionais como são conhecidos na técnica (Veja, por exemplo, McCormick, S. e outros (1986), Plant Cell Reports 5:81-84). As plantas resultantes podem ser auto-polinadas, polinadas com o mesmo filamento transformado ou filamentos diferentes ou hibridizadas, e a planta resultante tendo as características desejadas associadas com SEQ ID NO: 1 ou o homólogo deste identificado. Duas ou mais gerações podem ser desenvolvidas para garantir que esta característica fenotípica seja estavelmente mantida. Alternativamente, em colheitas vegetativamente propaga-

das, as plantas mutantes/transgênicas maduras podem ser propagadas por corte ou por técnicas de cultura de tecido para produzir plantas idênticas. A seleção de plantas mutantes/transgênicas pode ser realizada e novas variedades podem ser obtidas e propagadas vegetativamente para uso comercial.

5 Partes de planta, incluindo, porém não limitadas a raízes, troncos, folhas, botões, flores, brotos, sementes, tubérculos, frutos e galhos obtidos de plantas obtidas pelos métodos da presente invenção são também fornecidas.

10 As plantas ou partes de planta transformadas pelos métodos da invenção podem ser visualmente identificadas com base na expressão dos traços. Mais preferivelmente, as plantas transformadas ou partes de planta são identificadas usando análise molecular usando sondas de oligonucleotídeo específicas e/ou amplificação do gene-alvo. O DNA ou RNA da planta-objeto ou parte da planta a ser analisada pode ser extraída por vários métodos adequados conhecidos por aqueles versados na técnica, tais como são descritos em uma ampla faixa de textos bem-conhecidos, incluindo (porém não limitado a) Sambrook, J. e outros, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Sambrook, J. e Russell, D.W. (2001), "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 3ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15 e referências citadas aqui e Ausubel e outros (eds) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (2000), incorporados aqui por referência cruzada. Veja também os métodos descritos em Lukowitz, W., Gillmor, C.S. e Scheble, W-R. (2000) "Positional Cloning in Arabidopsis: Why It Feels Good to Have a Genome Initiative Working for You" *Plant Physiology* 123, 795-20 805, e referências citadas aqui.

25 O DNA ou RNA extraído pode ser analisado quanto a presença ou ausência do transgene por qualquer método adequado como conhecido na técnica, e em que o método/estratégia que é empregado pode depender da especificidade desejada, e da disponibilidade de sequências e/ou enzimas adequadas. Por exemplo, o RNA extraído pode ser analisado usando o método TRIzol, e tratando o RNA extraído com DNaseI livres de RNase antes de realizar o PCR quantitativo.

30

Os pares de iniciadores adequados para ampliar as porções de HOG1 incluem: PET1: 5'-A(AG) ATGCC(CT) GG(ACT) CT (ACT)ATG(GT)C(ACT)T-3' (SEQ ID NO: 24) e PET2: 5'-TC (AG) A-ACTTGCTCTTGGT(AG)AC(AG)-3' (SEQ ID NO: 25). Outros iniciadores adequados ou pares de iniciadores para analisar o gene de HOG1 ou homólogos dos mesmos podem ser designados com base em SEQ ID NO: 1.

Os métodos e reagentes para uso em uma reação de ampliação de PCR são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica. Os protocolos e reagentes adequados amplamente dependerão das circunstâncias individuais. A orientação pode ser obtida de uma variedade de fontes, tais como, por exemplo, Sambrook, J. e outros, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Sambrook, J. e Russell, D.W. (2001), "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 3ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, e referências citadas aqui e Ausubel e outros (eds) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (2000), incorporados aqui por referência cruzada. Uma pessoa versada na técnica também facilmente apreciará que vários parâmetros da reação de PCR podem ser alterados sem afetar a capacidade de ampliar o produto desejado. Por exemplo, a concentração de Mg^{2+} e temperaturas empregadas podem ser variadas. Similarmente, a quantidade de DNA genômico usado como um modelo pode também ser variado dependendo da quantidade de DNA disponível.

Outros métodos de análise incluem eletroforese, tais como eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose, uma técnica comumente usada por aqueles versados na técnica para separação de fragmentos de DNA em uma base de tamanho. A concentração de agarose ou poliacrilamida no gel em grande parte determina a capacidade de resolução do gel e a concentração apropriada de agarose ou poliacrilamida, portanto dependerá do tamanho dos fragmentos de DNA a serem distinguidos.

A detecção e/ou determinação da existência do transgene ou homólogo do mesmo podem ser auxiliadas por análise de computador usando qualquer software apropriado. Os pacotes de software adequados para comparação de determinadas sequências de nucleotídeo são bem-

conhecidos na técnica e são facilmente disponíveis.

Abreviações

- 2iP - 2-isopenteniladenina
- AHK - Arabidopse Histidina Quinase
- 5 AHP - Proteínas de Fosfotransferência de Arabidose Histidina
- AMM - Meio mínimo de asparagina
- ARR - Reguladores de Resposta de Arabidopse
- AS - Supressão de Antissense
- A - Adenosina
- 10 BA - Benziladenina
- BLAST - Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento de Local Básico
- CAB - gene de proteína de ligação de clorofila a/b
- CaMV - Vírus Mosaico de Couve-flor
- CRE - Resposta de citoquinina
- 15 cDNA - ácido deoxirribonucleico complementar
- DNA - ácido deoxirribonucleico
- ELISA - ensaio imunossorvente ligado à enzima
- ETR1, ERS2, ETR2 e EIN4 - receptores de etileno
- FAB - bombardeio de átomo rápido
- 20 G - Guanina
- GFP - proteína fluorescente verde
- HOG 1 - silenciamento de gene 1 dependente de homologia
- HSPs - par de sequência de classificação elevada
- ITC - calorimetria de titulação isotérmica
- 25 KD - constante de dissociação
- KNAT1 - homólogo unido 1 de *Arabidopsis thaliana*
- LAI - índice de área da folha
- LAR - relação de área da folha
- mRNA - RNA mensageiro
- 30 NCBI - Centro Nacional para Informação de Biotecnologia
- NOS - nopalina sintase
- OCS - octopina sintase

OE - Superexpressão

OsCBP - Proteína de Ligação de citoquinina de *Oryza sativa*

PCR - Reação em cadeia de polimerase

PNAs - ácidos nucleicos de peptídeo

5 PETCBP - Proteína de Ligação de citoquinina de *Petunia hybrida*

RNA - ácido ribonucleico

RNAi - interferência de RNA

RuBisCo - ribulose bisfosfato carboxilase

SAH - S-adenosilhomocisteína

10 SAM - S-adenosilmetionina

siRNA - RNA interferente pequeno

SSC - 1-2 X de cloreto de sódio e citrato de sódio

SAHH - S-adenosil-L-homocisteína hidrolase

SLA - área da folha específica

15 STM - fator de transcrição sem meristema de Broto

T - timina

TDNA - DNA transferido

Tm - ponto de fusão térmico

U - Uracila

20 WT - tipo selvagem

ZR - ribosídeo de zeatina

Breve Descrição dos Desenhos

Os desenhos de acompanhamento ilustram uma modalidade descrita e servem para explicar os princípios da modalidade descrita. Deve
25 ser entendido, entretanto, que os desenhos são designados para propósitos de ilustração somente, e não como uma definição dos limites da invenção.

A Figura 1 mostra os resultados da calorimetria de titulação isotérmica, localização de HOG1 e análise de expressão. A) Ensaio de ligação de citoquinina foi realizado com ITC. O painel de topo mostra os dados de aquecimento bruto corrigidos para tendência de referência obtida de injeções
30 de 0,1 μ M de zeatina na célula de amostra contendo 2 μ M de TAP-HOG1 purificado. O painel do fundo mostra a isoterma de ligação criada por plota-

gem das áreas de pico de aquecimento contra uma relação molar de zeatina adicionada ao HOG1. A inserção mostra a proteína de TAP-HOG1 purificada (60 kDa) das plantas transgênicas. B) Ensaio com a citoquinina sintética derivada de ureia, tidiazurona realizado como no caso de zeatina. C) A ligação

5 de HOG1-citoquinina é endotérmica com 2:1 de estequiometria. Os valores de KD variaram de 16,9 nM a 20,6 nM para as três citoquininas testadas, isto é, zeatina, benziladenina (BA) e 2-isopenteniladenina (2iP). Os valores de KD para adenina e NAD⁺ foram 2,1 µM e 39,5 µM, respectivamente, mostrando uma especificidade de citoquinina de HOG1. D) Linhagens transgêni-

10 cas expressando proteína de fusão GFP-HOG1 exibiu o mesmo fenótipo como as linhagens de 35S:HOG1 mostrando que a proteína de fusão manteve sua função. E) Proteína de fusão de GFP-HOG1 foi localizada na membrana de plasma. O imageamento de célula de raiz de muda viva foi realizado usando microscópio de varredura a laser confocal (Zeiss CLSM 510) com

15 488 nm de laser de argônio em combinação com um aparelho de filtro de passagem de faixa de 505 a 530nm. A inserção mostra, em uma única célula, que a proteína está localizada na membrana de plasma. F) A análise de PCR em tempo real quantitativa de expressão de HOG1 mostrou que o gene é constitutivamente expresso em todas as partes da planta examinada.

20 A Figura 2 mostra a análise de expressão de HOG1 nas linhagens de superexpressão e supressão de antissense de Arabidopsis por PCR em tempo real quantitativo. A) Oito linhagens de superexpressão independentes mostraram aumento de 3 a 20 vezes em níveis de transcrição de HOG1 comparados ao tipo selvagem. Os fenótipos B) e C) das linhagens de

25 superexpressão usados para análise de PCR em tempo real foram uniformes a despeito das variações em níveis de transcrição. D) As linhagens de supressão de antissense de HOG1 mostraram diminuição de 2 a 10 vezes nos níveis de expressão das transcrições quando comparados com o tipo selvagem. E) e F) Os fenótipos de tempo de fluorescência das oito linhagens

30 de antissense usadas na análise de expressão foram diretamente relacionados com o nível de supressão de transcrições de HOG1. G), H), I) e J) Três mudas individuais de linhagem de OE 6 e duas plantas WT foram pulveriza-

das em dias alternados com zeatina ($0,01 \mu\text{M}$) durante um período de quatro semanas para ver se a quitocina exogenamente aplicada pode retardar o florescimento nas linhagens OE na mesma idade como o WT. G) As plantas OE pulverizadas com zeatina mostraram bloqueio retardado comparado com
 5 linhagens de OE de controle (na zeatina), ao mesmo tempo em que, I) as linhagens de OE de controle bloqueiam em 4 estágios de folha de involúcro. H) As plantas OE pulverizadas com zeatina mostram bloqueio somente após elas terem alcançado o estágio de 6 a 7 folhas, quase na mesma idade como as plantas WT, mostrando salvamento das linhagens de OE pela citoquinina exogenamente aplicada. J) Os indivíduos de controle (sem pulverização de zeatina) da linhagem de OE floriram completamente e se desenvolveu em sua capacidade máxima neste estágio.

Figura 3 mostra os fenótipos de plantas de superexpressão de HOG1 (OE), supressão de antissense (AS) e do tipo selvagem (WT). A) Linhagens de OE de HOG1 mostram o florescimento quando elas desenvolveram somente quatro folhas de roseta enquanto o WT não iniciou o florescimento ainda. B) Linhagens de AS de HOG1 mostram o florescimento retardado (14 folhas de estágio no tempo de bloqueio) enquanto o WT teve inflorescência bem desenvolvida. C) Comparação de fenótipos em maturidade de linhagens de OE, WT e AS. Um retardamento de crescimento total das
 15 linhagens de OE e fenótipo de ramificação abundante das linhagens de AS em 30 dias após a germinação quando comparado com WT, foi visto. D) Tamanho de folha de roseta aumentado na linhagem de AS comparado com as linhagens de WT e OE. E) O tamanho de siliqua foi aumentado nas linhagens de AS comparado com da linhagem de WT, ao mesmo tempo em que o tamanho foi significativamente reduzido nas linhagens de OE (escala em bar = 1cm). F) A resposta de calos às várias concentrações de citoquinina exógena (zeatina) na presença do ácido indolbutírico de auxina ($0,2 \mu\text{g/ml}$). O calo das linhagens de AS exibiu um forte fenótipo insensível à citoquinina,
 25 isto é, fraca estimulação de proliferação de célula e falta de indução de broto adventício após 3 semanas de cultura. O calo da linhagem de OE respondeu similarmente ao WT, isto é, ambos exibiram desenvolvimento de calo normal
 30

e indução de broto adventício, mostrando que HOG1 é um regulador de citoquinina positivo. G) Quantificação de níveis de citoquinina nas linhagens de OE, WT e AS. As citoquininas endógenas foram quantificadas pelo método de imunoensaio com anticorpo monoclonal iPA e ZR usando kits de detecção de adenosina de isopentenila e ribosídeo de zeatina (Sigma). Os valores determinados representam o $\pm$ SD médio de três replicações de três extrações independentes. As citoquininas medidas são isopenteniladenina (iP), isopenteniladenosina (iPA), zeatina (Z) e ribosídeo de zeatina (ZR). H) Ensaio espectrofotométrico de atividade de homocisteína de S-adenosila hidrolase (SAHH) das várias linhagens e com a proteína de TAP-HOG1 purificada. Nenhuma diferença significativa na atividade foi observada em extratos de proteína brutos das linhagens de WT, OE e AS, ao mesmo tempo em que a proteína TAP-HOG1 purificada não tem atividade de SAHH mensurável.

Figura 4 mostra a análise de PCR em tempo real quantitativa de genes responsivos de quitocina selecionados e interação de HOG1-AHP1. As mudas colhidas para extração de RNA antes e após um tratamento de pulso com benziladenina (BA) em 0 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M ou 5 μ M durante vários intervalos de tempo (5 min, 15 min, 30 min e 1h) de três linhagens de superexpressão (OE1, OE12, OE18) e supressão de antissense (AS1, AS8, AS21) independentes. A aplicação de BA causou um aumento dependente da dose de transcrições de KNAT1 e STM. A) As linhagens de AS mostraram a super-regulação de KNAT1 e STM (genes homeobox envolvidos na função de meristema), ao mesmo tempo em que as linhagens de OE mostraram a sub-regulação destes dois genes na ausência de BA exógeno. Com 5 μ M de BA após 1h, a expressão de KNAT1 e STM mostrou menos do que uma mudança de duas vezes, que é insignificante daquela do WT. B) ARR4 e ARR6 (reguladores de resposta tipo A induzidos por citoquininas) também mostram tendência similar nos níveis de expressão. C) Purificação de complexo de TAP-HOG1. A proteína total extraída de plantas de 35S:TAP-HOG1 (faixa 1) e após a purificação usando colunas de afinidade para rótulos ProtA e CBP, resultou na identificação de aproximadamente 24 kDa de faixa (asterisco) que foi confirmada ser AHP1 por sequenciamento

de terminal de N (faixa 2). Western blot de proteína total sondada com anticorpo para rótulo de ProtA mostrou a presença de uma faixa de 71 kDa correspondendo a TAP-HOG1. D) eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida de purificação de AHP1 recombinante. AHP1 foi expresso com rótulos seis-His e tioredoxina em *E. coli*. A faixa 1 tem lisado de célula total e AHP1 purificado com os rótulos está na faixa 2. E) A interação de TAP-HOG1 e AHP1 foi realizada com ITC. O painel de topo de E) mostra os dados de aquecimento bruto corrigidos para tendência de referência obtida de injeções de 0,1 μ M de AHP1 purificado na célula de amostra contendo 2 μ M de TAP-HOG1 purificado. O painel do fundo mostra a isoterma de ligação criada por plotagem das áreas de pico de aquecimento contra a relação molar de AHP1 adicionado a HOG1. A ligação de TAP-HOG1 e AHP1 é endotérmica com um valor de KD de 23,8 nM.

Figura 5 é uma representação esquemática da série de reação de transdução e sinal de citoquinina através de HOG1. O sinal de citoquinina é percebido por HOG1 na membrana de plasma. O dímero de HOG1 inicia uma cascata de sinalização através de AHP1, que pode interagir com ARRs do tipo B (por exemplo, ARR1, ARR2) e ARRs do tipo A (por exemplo, ARR4, ARR5).

Figura 6 mostra o alinhamento de sequência múltiplo de HOG1 com homólogos. A sequência de aminoácido deduzida HOG1 (SEQ ID NO: 1) foi alinhada com a sequência de SAHH de *Petunia hybrida* (SEQ ID NO: 13), *Nicotiana tabacum* (SEQ ID NO: 3), *Oryza sativa* (SEQ ID NO: 5), *Triticum aestivum* (SEQ ID NO: 7), e *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 26). As duas assinaturas conservadas de SAHH estão em negrito. Na 2ª assinatura de SAHH, três resíduos de glicina conservados representando o domínio de ligação de dinucleotídeo estão sublinhados. O estiramento de Terminal de N de 7 (posição 1-7 de HOG1) aminoácidos e um estiramento adicional de 41 aminoácidos (posição 150-191 de HOG1) bem como a região de transmembrana helicoidal em *italico* (posição 59-76 de HOG1).

Figura 7 mostra o efeito de aplicação exógena de citoquininas nas linhagens do tipo selvagem (WT), de superexpressão (OE) e de supres-

são de antissense (AS) de HOG1. Três mudas individuais de linhagem de OE 6 e linhagem AS 12 foram pulverizadas em dias alternados com zeatina ou quinetina (0,01 μ M), durante um período de quatro semanas. Duas plantas de WT foram similarmente tratadas para comparação. A) e C) Três indivíduos de linhagem de OE 6 pulverizada com zeatina e quinetina não mostraram bloqueio quando comparado com as linhagens de OE de controle no estágio de folha 4 de crescimento. E) As linhagens de OE de controle bloqueiam no estágio de folha 4. B) e D) Três indivíduos da linhagem de OE 6 pulverizados com zeatina e quinetina respectivamente, mostram bloqueio somente após eles terem alcançado o estágio de folha de 6-7. Isto mostra o salvamento parcial das linhagens de OE pelas citoquininas exogenamente aplicadas. F) Os indivíduos de controle da linhagem de OE 6 maduraram neste estágio. G), H), I), J) e K) As linhagens de AS que receberam os *sprays* de citoquinina não mostram qualquer diferença significativa no fenótipo quando comparado com as linhagens de AS de controle. Isto mostra que a superexpressão de HOG1 induz ao esgotamento de teor de citoquinina endógena (como mostrado na Tabela 1) e, portanto, o fenótipo. (Note que os painéis A, B, E e F estão na Figura 2 principal enquanto os painéis G, H, I e J, e estes estão incluídos aqui para facilidade de comparação somente).

Figura 8 mostra plantas de *Arabidopsis thaliana* transgênica. (a) Mudanças de *Arabidopsis thaliana* com superexpressão (OE) de HOG1 mostraram bloqueio precoce, porém a supressão de antissense (AS) de HOG1 leva ao florescimento retardado comparado ao controle do tipo selvagem (WT) em cerca de 3 semanas. (b) As plantas maduras de duas linhagens transgênicas diferentes cada de OE (OE8, OE12) e AS (AS8, AS21) comparado com o tipo selvagem (WT) fotografado em 30 dias após a germinação. As florescências das linhagens de AS foram abundantemente ramificadas e a biomassa foi significativamente mais elevada comparada com as plantas de OE e WT. (c) A área da folha e (d) comprimento da siliqua bem como sementes (inserções no painel f) das linhagens de AS foram significativamente mais elevadas do que de OE e WT. (e) A análise de PCR em tempo real quantitativa de níveis de expressão de transcrições de HOG1 nas plantas em (d). (f)

A quantificação da área da folha, peso de semente, número de sementes por siliqua e concentração endógeno da adenina de isopentenila de citoquinina mostraram que os valores foram mais elevados em AS seguido pelas linhagens de WT e OE, respectivamente.

5 Figura 9 mostra plantas de arroz transgênicas (*Oryza sativa ssp. japonica cv Nipponbare*) abrigando o cDNA de HOG1 de *Arabidopsis* em superexpressão (OE) ou supressão de antissense (AS) induzindo aos níveis de OsCBP modificados. (a) As mudas de linhagens de OE e AS no tempo de iniciação da agricultura levam quatro semanas após a germinação. (b) As
10 plantas maduras das linhagens de OE e AS em cerca de 90 dias após a germinação. As linhagens de AS exibem agricultura abundante e aumento em biomassa, ao mesmo tempo em que as plantas de OE permaneceram anão comparado com WT. (c) As plantas maduras desarraigadas de OE, WT, AS e cossupressão (CS) mostraram que as plantas de AS e CS tiveram
15 números comparavelmente mais altos de cultivos por planta. (d) As plantas de CS mostraram ramificação dos nodos acima do solo resultando em um aumento total no número de panículas por planta. (e) As panículas das linhagens de OE foram significativamente menores comparadas àquelas de outras linhagens. (f) A análise de PCR quantitativa em tempo real de níveis
20 de expressão de transcrições de OsCBP no WT, níveis de transcrição de *Arabidopsis* HOG1 introduzido nas linhagens de OE (S-2L, S-9T), redução nos níveis de transcrição de OsCBP endógeno nas linhagens CS (CS-4T, CS-1) e AS (AS-1S-2, AS-4S-2). (g) Quantificação do número de cultivos, panículas, área da folha, peso fresco e número total de sementes por planta
25 mostraram que os parâmetros medidos foram significativamente maiores nas linhagens de AS e CS comparado com WT, que está de acordo com as observações de *Arabidopsis*.

 Figura 10 mostra: (a) alinhamento múltiplo de HOG1 (SEQ ID NO: 1), PETCBP (SEQ ID NO: 13) e OsCBP (SEQ ID NO: 5). PETCBP (SEQ
30 ID NO: 13) e OsCBP (SEQ ID NO: 5) mostraram 88% de identidades. HOG1 (SEQ ID NO: 1) e OsCBP (SEQ ID NO: 5) mostraram 90% de identidade quando comparado com 88% de identidade para PETCBP (SEQ ID NO: 13)

e HOG1 (SEQ ID NO: 1). (b) O blasto de genoma de OsCBP mostra sua presença no cromossoma 11 (Os11g0455500), indicando que é uma única cópia no genoma de arroz (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Figura 11 mostra os resultados de ensaio de ligação de citoqui-
 5 nina realizado com ITC. O painel de topo mostra os dados de aquecimento
 bruto corrigidos para tendência de referência obtida de injeções de 0,1 μ M
 de benziladenina em uma célula de amostra contendo 2 μ M de TAP-HOG1
 purificado. O painel de fundo mostra a isoterma de ligação criada por plota-
 10 gem das áreas de pico de aquecimento contra a relação molar de benzilade-
 nina adicionada a HOG1.

Figura 12 mostra os fenótipos de plantas de arroz transgênico
 (*Oryza sativa ssp. japonica cv Nipponbare*) com superexpressão (OE) de
 Arabidopsis HOG1 ou supressão de antissense (AS) de OsCBP induzido por
 HOG1 de Arabidopsis. (a) A linhagem de OE com efeito de cossupressão
 15 (no painel direito, com o controle no esquerdo) mostra o número de cultivos
 aumentado por planta. (b) As linhagens de AS, do tipo selvagem (WT) e de
 cossupressão (CS) em maturidade. As linhagens de AS e CS exibem maior
 número de cultivos (ramificação) por planta comparada à linhagem origem
 híbrida (WT). (c) Nenhuma diferença significativa no tamanho da semente
 20 das linhagens de WT e AS. Alguma redução no tamanho da semente é ob-
 servada em OE quando comparado com WT. (d) e (e) Southern blots das
 linhagens de OE e AS na geração de T1. (d) 1ª faixa é o marcador. As faixas
 2 a 11 são independentes das linhagens de OE. A faixa 2 (linhagem OE S1),
 faixa 5 (linhagem de OE 4) e faixa 8 (linhagem de OE 7) mostram inserções
 25 únicas. Faixa 4 (linhagem de OE 3), faixa 7 (linhagem de OE 6), faixa 9 (li-
 nhagem de OE 9), faixa 10 (linhagem de OE 10) e faixa 11 (linhagem de OE
 11) mostram inserções duplas onde as faixas 3 (linhagem de OE 2) e faixa 6
 (linhagem de OE 5) mostram três inserções cada. (e) faixa 2 (linhagem de
 AS1), faixa 3 (linhagem de AS2), faixa 4 (linhagem de AS3) e faixa 6 (linha-
 30 gem de AS5) mostram inserções únicas. Faixa 5 (linhagem de AS4) mostra
 inserção dupla. Para cada faixa, o DNA genômico (6 μ g) extraído das folhas
 que foi digerido com enzimas de EcoRI foi usado. A sonda usada foi DIG

rotulado, gene de higromicina fosfotransferase. As manchas foram lavadas em alta rigorosidade antes que os sinais fossem visualizados.

Melhor Modo

Os exemplos não-limitantes da invenção, incluindo o melhor modo, e um exemplo comparativo serão também descritos em maiores detalhes por referência para Exemplos específicos, que não devem ser considerados de forma alguma limitantes do escopo da invenção.

EXEMPLO 1

O silenciamento de gene dependente de homologia 1 de *Arabidopsis* (HOG1) é um Receptor de citoquinina Putativo

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais de planta e condições de crescimento

Ecotipo Columbia de *Arabidopsis thaliana* foi usado neste estudo. As plantas foram desenvolvidas com 16 h de luz/8 h de escuridão a 22°C. Para ensaios de muda, as sementes foram esterilizadas na superfície e estratificadas no escuro a 4°C durante 2 dias e em seguida expostas à luz branca ($75 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). As mudas foram crescidas a 22°C em meio Murashige-Skoog (MS) com 3% de sacarose e 0,9% de ágar. Para experiência de germinação, as sementes de bateladas específicas foram semeadas em meio de MS sem sacarose.

Construção de plasmídeo e transformação genética de *Arabidopsis*

O cDNA de HOG1 de *Arabidopsis thaliana* de tamanho natural (SEQ ID NO: 2) foi ampliado por estratégia 5' e 3' RACE. O kit de Ampliação de cDNA SMARTTM RACE (Clontech Laboratories) foi usado para identificar as sequências finais de 5' e 3' cDNA (5'/ 3'-RACE) de cDNA. Estes produtos de PCR foram sequenciados. A sequência parcial e produtos de PCR RACE foram alinhados juntos para obter a sequência de cDNA de tamanho natural para HOG1 de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 2).

O vetor binário de pGreen 0229 (Yu e outros *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:7827-7832, 2004) foi usado para todos os constructos de transgene. Para supressão de antissense, um fragmento de 850bp de HOG1 abrangendo as duas assinaturas de SAHH (SEQ ID NO: 15) foi usado. A

estrutura de leitura aberta completa de cDNA de HOG1 foi usada para o constructo de superexpressão e para a construção de GFP-HOG1.

HOG1 direcionado por TAP foi preparado com rótulos de peptídeo de ligação de Prot A e calmodulina, com um sítio de clivagem TEV entre os dois rótulos (Forler e outros *Nature* 21:89-92, 2003). Os constructos foram introduzidos em *Arabidopsis thaliana* por método de infiltração à vácuo mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (Hiei e outros *supra*).

Análise de PCR em tempo Real

O RNA total foi extraído de mudas com o método de TRIzol (Invitrogen). O RNA total (0,5 µg) tratado com DNaseI livre de RNase foi usado para cada reação de PCR quantitativa realizada com o kit de RT One-Step (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. PCR quantitativo em tempo real foi realizado usando SYBR green. Os valores de Ct foram normalizados contra o valor de *Tubulin2* Ct para cálculo de vezes de alteração de acordo com o protocolo do fabricante.

Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

A afinidade de ligação de citoquinina e análise termodinâmica da interação entre HOG1 e citoquininas foram examinadas por ITC (MCSITC, Microcal, Northampton, USA). Três citoquininas de ocorrência natural (zeatina, benziladenina e adenina de isopentenila) e tidiazurona (uma citoquinina sintética derivada de ureia) foram usadas. Adicionalmente, a adenosina e NAD foram usados como moléculas de controle para verificar a especificidade de ligação de HOG1 às citoquininas. Os dados foram analisados por MICROCAL ORIGIN versão 2.9 usando o método de mínimos quadrados não-linear, de melhor ajuste para um sítio de ligação. A estequiometria de ligação (n), e a constante de associação (KA) foram calculadas das curvas ajustadas. Subsequentemente, KD foi calculado como 1/KA. Os dados de aquecimento bruto foram corrigidos para tendência de referência obtida de injeções de 0,1 µM de AHP1 purificado na célula de amostra contendo 2 µM de TAP-HOG1 purificado. As isotermas de ligação foram criadas por plotagem das áreas de pico de aquecimento contra a relação molar de AHP1 adicionado a HOG1.

Localização Subcelular de proteína de fusão de GFP-HOG1

As plantas transgênicas expressando construídos individuais de fusão de 35S:GFP-HOG1 foram selecionadas de acordo com seu fenótipo. As raízes de mudas de 5 dias foram cortadas e montadas em estiramento de meio veículo MS imediatamente antes da microscopia de varredura a laser confocal (Zeiss CLSM 510) com um laser de argônio de 488 nm em combinação com um aparelho de filtro de passagem de faixa de 505 a 530 nm.

Ensaio de resposta de quitocina de calo

Os segmentos de raiz de muda foram incubados durante 4 dias no meio de indução de calo (meio MS suplementado com 0,5 µg/ml de ácido 2,4-diclorofenoxiacético e 0,05 µg/ml de quinetina). Os calos resultantes foram incubados no meio de indução de broto (meio MS suplementado com 0,2 µg/ml de ácido indolbutírico e várias concentrações de zeatina) durante 30 dias com subcultura para meio fresco em intervalos de 10 dias de acordo com o método de Inoue e outros (*Nature* 409:1060-1063, 2001).

Conteúdo de citoquinina e ensaio de enzima SAHH

As citoquininas foram extraídas de plantas totais com 100% de metanol e quantificadas usando kits de detecção de adenosina de isopentenila e ribosídeo de zeatina (Sigma) como descrito em Yang e outros (*FEBS* 555:291-296, 2003). O ensaio espectrofotométrico de SAHH foi realizado nos extratos de proteína bruta de plantas de bloqueio como descrito em Rocha e outros (*Plant Cell* 17:404-417, 2005).

Expressão de Genes de Resposta de Citoquinina Primária

Para análise de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) de expressão de gene induzível por citoquinina, as sementes foram germinadas em meio MS com 3% (peso/volume) de sacarose e desenvolvidas durante 6 dias. O tratamento de citoquinina foi realizado por incubação das mudas no mesmo meio líquido de MS+sacarose (nenhum ágar) suplementado com 0, 0,01, 0,1, 1 ou 5 µM [solubilizado em 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluído com o meio MS] durante 5 min, 15 min, 30 min ou 1 h. As mudas de controle foram incubadas com DMSO (0,1%, a concentração usada para dissolver as citoquininas para o tratamento) durante durações corresponden-

tes e usada para análise de expressão. Antes da preparação de RNA, as mudas de WT, OE e AS foram reunidas e armazenadas em solução de RNAlater (Qiagen, Valencia, CA). O RNA total foi extraído usando o Mini Kit de planta Rneasy (Qiagen). Os reagentes de RT-PCR SYBRgreen (Applied Biosytroncos) foram usados para sintetizar o cDNA de filamento duplo. O número de transcrições presentes em replicações biológicas cada das mudas de WT, OE e AS, com ou sem BA e DMSO, foi determinado de três replicações independentes. A indução de dobras das transcrições foi calculada de acordo com as instruções do fabricante (ABI Prism 7700 Sequence Detection Sytronco, User Bulletin #2).

Estudos de Interação de TAP-HOG1 e AHP1

O complexo de proteína de TAP-HOG1 foi purificado usando os rótulos de ProtA e CBP como descrito antes em Forler e outros (*supra*). Para suspender ProtA, contas de IgG Sefarose (Amersham Biosciences #17-0969-01) e para resina de afinidade de Calmodulin de demolição de CBP (Stratagene #214303-52) foram usadas. A proteína purificada foi submetida à SDS-PAGE e manchada para membranas de PVDF para análise de Western blot usando protocolos padrões. Além disso, a demolição do complexo de HOG1 foi submetida à SDS-PAGE eletroforese, e o sequenciamento de terminal de N foi feito para identificar as faixas proeminentes obtidas. Por que AHP1 foi a faixa de proteína de interação putativa principal, o cDNA para AHP1 foi clonado de Arabidopsis e AHP1 recombinante foi expresso em BL21 de *E. coli* com um rótulo de seis-HIS e rótulo de tioredoxina (em um vetor de superexpressão PET32EK/LIC, Novagen). O AHP1 recombinante com os rótulos foi purificado usando coluna de afinidade de HIS-rótulo (Bio-Rad). Os estudos de interação de proteína (HOG1-AHP1) foram realizados por ITC (MCS-ITC, Microcal, Northampton, USA) como descrito acima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os presentes inventores usaram supressão de antissense e estratégias de superexpressão para analisar o envolvimento de HOG1 na sinalização e regulação de citoquinina de desenvolvimento de planta.

O clone de cDNA de HOG1 (SEQ ID NO: 2) exibiu similaridade

de sequência significativa para S-adenosil-L-homocisteína hidrolase (SAHH) de várias espécies de plantas e animais. A comparação com homólogos isolados de várias espécies de planta indicou que HOG1 é conservado em diversas espécies de planta (Figura 6). Em particular, o homólogo em *Petunia hybrida* (SEQ ID NO: 14) compartilhou 78% de similaridade de sequência com HOG1, o homólogo em *Nicotiana tabacum* (SEQ ID NO: 4) compartilhou 78% de similaridade de sequência com HOG1, o homólogo em *Oryza sativa* (SEQ ID NO: 6) compartilhou 82% de similaridade de sequência com HOG1, e o homólogo em *Triticum aestivum* (SEQ ID NO: 4) compartilhou 83% de similaridade de sequência com HOG1.

Para examinar a afinidade de ligação de citoquinina de HOG1, a proteína TAP-HOG1 foi purificada de *Arabidopsis thaliana* transgênico (abrigando 35S:TAP-HOG1), que foi também usado para estudos de interação de proteína-proteína. A proteína direcionada foi funcional por que as plantas transgênicas mostraram o mesmo fenótipo com aqueles das linhagens de superexpressão de HOG1. A proteína foi purificada usando os rótulos de Proteína A (Prot-A) e CBP (peptídeo de ligação de calmodulina). Após a purificação, a proteína manteve a porção de CBP do rótulo de TAP, resultando em um tamanho de 60 kDa (Figura 1A de inserção), considerando que HOG1 sozinho sem a porção de CBP do rótulo de TAP seria 56 kDa.

(a) Ligações de HOG1 às citoquininas com afinidade elevada

As moléculas de citoquinina se ligam à proteína purificada eficientemente como indicado por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) de TAP-HOG1 purificado e várias citoquininas. ITC, uma técnica biofísica usada para estudar os cinéticos de ligação de ligante-receptor produz parâmetros termodinâmicos importantes de uma interação, incluindo afinidade de ligação (K_A), e, portanto a constante de dissociação (K_D), bem como a estequiometria de ligação (n).

As moléculas de citoquinina (zeatina, benziladenina e adenina de isopentenila) e tidiazurona (uma molécula derivada de ureia sintética com atividade de citoquinina) foram usadas para os estudos de ligação. A adenina e NAD foram usados com controles para determinar a especificidade de

ligação de HOG1.

A estequiometria de ligação, como determinado por ITC, mostrou que dois monômeros de HOG1 ligam uma molécula de citoquinina (estequiometria de 2:1) (Figura 1A-1C), porém não liga tidiazurona (Figura 1B e 1C). Isto mostra a especificidade de HOG1 em ligação de citoquininas.

Como pode ser visto da Figura 1C, a constante de dissociação (KD) variou entre 16,9 a 20,6 nM para as diferentes citoquininas testadas. Além disso, a KD para adenina foi 2,1 μ M, que sugere uma afinidade significativamente menor de HOG1 para adenina do que para uma molécula de citoquinina. Isto é de acordo com o fato que a adenina elicia resposta de citoquinina somente fraca quando usada em concentrações relativamente elevadas em algumas culturas de tecidos.

Uma vez que NAD^+ é o cofator conhecido para SAHH, o valor de KD para HOG1 e complexo de NAD^+ por ITC foi medido e constatado ser 39,5 μ M (Figura 1C), o que também sugere que HOG1 é um receptor de citoquinina e não é provavelmente uma enzima de SAHH funcional.

(b) HOG1 está localizado na membrana de plasma

Uma pesquisa de domínio para a proteína HOG1 foi conduzida usando o recurso de rede PHDhtm de Columbia University (www.cubic.bioc.columbia.edu). A pesquisa mostrou que a proteína de HOG1 tem uma estrutura do tipo de receptor típica. A Proteína HOG1 tem uma hélice de transmembrana predita (abrangendo 18 aminoácidos de resíduos 59 a 76 de SEQ ID NO: 1), e o domínio de ligação de citoquinina predita (abrangendo 409 aminoácidos de resíduos 77 a 485 de SEQ ID NO: 1) reside fora da membrana. A proteína também tem um sítio putativo dentro do citoplasma para interação com intermediários de sinalização a jusante, que compreende 58 aminoácidos no terminal de N (de resíduos 1 a 58 de SEQ ID NO: 1).

Para fisicamente determinar a localização subcelular da proteína HOG1, as plantas de Arabidopsis transgênicas expressando fusão de proteína fluorescente verde (GFP)-HOG1 foram geradas. Das sete linhagens de GFP independentes isoladas, três foram selecionadas para análise. As plan-

tas transgênicas de geração T3 expressando a proteína de fusão de GFP-HOG1 mostraram o mesmo fenótipo como as linhagens de superexpressão de HOG1 (Figura 1D), que indica que a proteína de fusão manteve sua função.

5 A microscopia de varredura a laser confocal de raízes recentemente cortadas das linhagens selecionadas e montadas em veículo MS de meio estiramento mostrou que GFP-HOG1 está localizado na membrana de plasma (Figura 1E), que sugere que HOG1 é um receptor de membrana para citoquininas. Como controle, um relato anterior para *Arabidopsis* foi usado, onde 35S:GFP foi mostrado ser razoavelmente uniformemente expresso no citoplasma e núcleo (Zhang *Plant Cell* 17:1306-1316, 2005). Com base na análise de sequência, uma região de transmembrana helicoidal (abrangendo 18 aminoácidos) está presente em HOG1 e outros homólogos de planta, porém não no SAHH de ser humano e rato (Figura 6), ambos dos
15 quais são proteínas citoplásmicas (Shu e outros *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:19788-19793). Além disso, a enzima de SAHH ativa é esperada ser uma proteína solúvel, em vez de manter a membrana de plasma ligada, por que a enzima está intimamente associada com reações de metilação ocorrendo em vários compartimentos celulares. Portanto, os resultados experimentais
20 presentes com GFP-HOG1 sugerem que a proteína HOG1 seja o receptor de membrana.

(c) Plantas de superexpressão e supressão de antissense de HOG1 mostram fenótipos de oposição

A análise de PCR quantitativa em tempo real indicou que HOG1
25 é constitutivamente expresso em *Arabidopsis*, com níveis relativamente mais elevados nas folhas e tronco de inflorescência (Figura 1F). Isto sugere que HOG1 possa desempenhar uma função fundamental na regulação de desenvolvimento de planta.

Para examinar o efeito dos níveis de expressão de HOG1 no
30 crescimento e desenvolvimento de planta, várias linhagens de superexpressão e supressão de antissense de HOG1 foram geradas. Várias linhagens de superexpressão de HOG1 mostraram um aumento de 3 a 20 vezes em

níveis de transcrição de HOG1 quando comparado com tipo selvagem (Figura 2A), ao mesmo tempo em que as linhagens de antissense mostraram uma supressão de 2 a 10 vezes (Figura 2B).

A expressão de transgene afetou todos os estágios de desenvolvimento de planta, e exibiu fenótipos consistentes em várias linhagens transgênicas independentes (Figura 2C, 2D, 2E e 2F). Os fenótipos foram registrados para 28 linhagens de superexpressão transgênicas independentes e 21 linhagens de supressão de antissense para fornecer outro suporte cujas alterações foram causadas pelo produto de gene introduzido. A germinação de semente ocorreu 4 a 5 dias antes nas linhagens de superexpressão comparadas com tipo selvagem, e quase 5 dias depois nas linhagens de supressão de antissense comparadas com o tipo selvagem (Tabela 1). Todavia, retardamento de crescimento significativo foi observado logo após a germinação das linhagens de superexpressão. A formação e expansão de novas folhas de roseta também foram atrasadas e limitadas durante todo o crescimento vegetativo nas linhagens de superexpressão.

Tabela 1. Germinação de semente, início de florescimento e senescência:

Cinco linhagens independentes foram usadas para cada observação. Para cada linhagem os dados são uma média de três réplicas independentes. As linhagens antissense mostraram germinação tardia, emergência tardia e senescência retardada.

Genótipo da planta	Germinação da semente (número de dias)	Início de floração/ Emergência (Número de folhas de roseta)	Senescência (Número de dias)
Tipo selvagem			
1	8	8	40
2	7	8	40
3	8	8	38
4	9	7	40
5	8	8	40
Média $\pm$ Desvio Padrão	$8 \pm 0,19$	$8 \pm 0,15$	$40 \pm 0,26$
Linhagens antissense			
AS1	13	14	55

Genótipo da planta	Germinação da semente (número de dias)	Início de floração/ Emergência (Número de folhas de roseta)	Senescência (Número de dias)
AS8	12	15	53
AS14	13	14	54
AS21	14	14	54
AS19	13	15	53
Média ± Desvio Padrão	13 ± 0,21	14 ± 0,11	54 ± 0,33
Linhagens de superexpressão			
OE1	4	4	30
OE8	4	3	32
OE12	4	3	30
OE18	5	4	28
OE14	4	4	30
Média ± Desvio Padrão	4 ± 0,13	4 ± 0,17	30 ± 0,28

As linhagens de supressão antissense não mostraram nenhum retardo de crescimento de broto a despeito da germinação de semente retardada. O início precoce de florescimento foi observado em superexpressão de plantas transgênicas com emergência no estágio de 4 folhas de roseta (Figura 3A, Tabela 1), quando comparado com a *Arabidopsis* do tipo selvagem e as linhagens antissense, que tinham pelo menos 8 e 14 folhas, respectivamente, no momento da emergência (Figura 3B, Tabela 1).

Após iniciação de florescimento, as linhagens de superexpressão não mostraram qualquer novo aumento em biomassa de folha e nenhum galho de inflorescência de eixo formou-se mesmo após 30 dias de desenvolvimento quando a senescência estabeleceu-se para estas linhagens (Figura 3C). Ao contrário, as linhagens antissense mostraram profuso desenvolvimento de galhos de inflorescência de eixo e senescência não ficou evidente nestas linhagens durante aquele período (Figura 3C). As linhagens antissense também tiveram a maior área da folha ($2,94 \pm 0,15 \text{ cm}^2$ por folha). A área da folha foi significativamente menor nas linhagens de superexpressão ($0,38 \pm 0,06 \text{ cm}^2$) e nas plantas tipo selvagem ($1,00 \pm 0,06 \text{ cm}^2$) (Figura 3D, Tabelas 2 e 3). A estatura total da planta, tamanho da siliqua e, como um resulta-

do, o número e peso de sementes por siliques (Tabelas 2 e 3) foram significativamente reduzidos nas linhagens de superexpressão, enquanto o comprimento da siliques nas linhagens de supressão antissense foi significativamente maior do que o do tipo selvagem (Figura 3E). Houve uma correlação positiva entre a área da folha e peso de semente por siliques, bem como a área da folha e número de sementes por siliques nas linhagens transgênicas (Tabela 3).

Tabela 2. Área da folha, peso de semente e número de sementes por siliques:

Os dados representam a média $\pm$ desvio quadrado de três réplicas independentes. Cinco linhagens independentes foram usadas em cada caso. As linhagens antissense tiveram um aumento de três vezes em biomassa da folha e um aumento de duas vezes em produção de semente em comparação ao tipo selvagem.

Genótipo da planta	Área da folha (cm ²)	Peso de semente por siliques (mg)	Número de sementes por siliques
<i>Arabidopsis</i> tipo selvagem (WT)			
1	1,04 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,01	35 $\pm$ 0,01
2	1,01 $\pm$ 0,01	1,01 $\pm$ 0,02	30 $\pm$ 0,02
3	0,90 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,02	26 $\pm$ 0,01
4	1,07 $\pm$ 0,02	1,18 $\pm$ 0,01	32 $\pm$ 0,01
5	0,98 $\pm$ 0,01	1,10 $\pm$ 0,01	29 $\pm$ 0,01
Média $\pm$ Desvio Padrão	1,00 $\pm$ 0,07	1,06 $\pm$ 0,11	30,40 $\pm$ 0,36
Linhagens antissense			
AS1	2,86 $\pm$ 0,01	1,79 $\pm$ 0,01	54 $\pm$ 0,02
AS8	3,12 $\pm$ 0,01	2,40 $\pm$ 0,02	63 $\pm$ 0,02
AS14	3,01 $\pm$ 0,02	1,96 $\pm$ 0,01	59 $\pm$ 0,02
AS21	2,79 $\pm$ 0,02	1,96 $\pm$ 0,01	57 $\pm$ 0,01
AS19	2,99 $\pm$ 0,02	2,00 $\pm$ 0,02	60 $\pm$ 0,01
Média $\pm$ Desvio Padrão	2,95 $\pm$ 0,13	2,02 $\pm$ 0,22	58,60 $\pm$ 0,37
Linhagens de superexpressão			
OE1	0,33 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,02	15 $\pm$ 0,01
OE8	0,40 $\pm$ 0,02	0,72 $\pm$ 0,01	17 $\pm$ 0,01

Genótipo da planta	Área da folha (cm ²)	Peso de semente por sílique (mg)	Número de sementes por sílique
OE12	0,49 ± 0,02	0,81 ± 0,01	19 ± 0,02
OE18	0,33 ± 0,02	0,70 ± 0,02	14 ± 0,02
OE14	0,40 ± 0,01	0,83 ± 0,01	17 ± 0,02
Média ± Desvio Padrão	0,39 ± 0,06	0,75 ± 0,07	16,40 ± 0,14

Tabela 3. Coeficiente de Correlação de Pearson (r) dos parâmetros que contribuem para biomassa e produção de semente:

O coeficiente de correlação foi testado entre: Área da folha (cm²) x peso de semente (mg) por sílique (A); Área da folha (cm²) x número de sementes por sílique (B); e peso de semente por sílique (mg) x número de sementes por sílique (C). Após a análise de correlação, o teste de Student foi realizado. Os valores de teste-t são dados entre parênteses. Os valores 'r' mostram correlação positiva em todos os testes. Com base nisto, é previsto que a supressão antissense de HOG1 induz ao aumento nos parâmetros-chave que contribuem para a biomassa da folha e produção de semente.

Genótipo da planta	A	B	C
Tipo selvagem	0,898 (t=2,043)	0,857 (t=2,755)	0,795 (t=3,84)
Linhagens antisentido de HOG1	0,763 (t=2,043)	0,847 (t=2,755)	0,912 (t=3,84)
Linhagens de super-expressão de HOG1	0,769 (t=2,078)	0,979 (t=2,878)	0,767 (t=2,269)

As linhagens de superexpressão maturaram mais cedo quando comparadas às plantas do tipo selvagem, as linhagens de superexpressão tendo maturado mais cedo do que as plantas do tipo selvagem aproximadamente quase uma semana (Figura 3A), enquanto as linhagens de supressão antissense maturaram mais tarde do que o tipo selvagem aproximadamente duas semanas. Além disso, a senescência foi retardada nas linhagens de supressão antissense de HOG1 aproximadamente duas semanas, quando comparadas à *Arabidopsis* do tipo selvagem (Figura 3C, Tabela 1).

Para estudar o papel de HOG1 como um receptor de citoquinina, culturas de calo de plantas HOG1 transgênicas foram examinadas quanto à sua sensibilidade às citoquininas exógenas similares ao estudo com CRE1

(Inoue e outros, *supra*). Ao contrário de meristemas apicais de broto em plantas inteiras, culturas de calo têm o potencial para responder às citoquininas exógenas fornecidas no meio nutriente e não são dependentes do transporte à longa distância do hormônio como em plantas intactas. Culturas de calo de linhagens de superexpressão de HOG1 e do tipo selvagem exibiram proliferação celular normal e indução de broto adventícia (Figura 3F). Ao contrário, calo das linhagens HOG1 antissense exibiu um forte fenótipo insensível de citoquinina, a saber, ausência de proliferação celular e falta de indução de broto adventícia em todas as concentrações de zeatina fornecidas (Figura 3F). Estes dados mostram que as funções de HOG1 como um regulador positivo de resposta de citoquinina.

(d) O contraste dos fenótipos de plantas transgênicas está relacionado com os níveis de citoquinina endógena.

Os mutantes de perda de função tripla de receptores de citoquinina do tipo AHK causaram um fenótipo oposto (Higuchi e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:8821-8826, 2004) àquele ser observado com a presente supressão antissense de HOG1. Este fenótipo contraditório pode ser explicado pelo impedimento potencial à translocação de citoquinina pela proteína de HOG1 nas linhagens de superexpressão.

O teor endógeno de citoquinina foi determinado para três linhagens independentes, cada uma linhagens do tipo selvagem, de superexpressão e supressão antissense. As concentrações de diferentes citoquininas avaliadas foram significativamente reduzidas nas linhagens de superexpressão em comparação ao tipo selvagem (Fig 3G). Isopentenil adenina é a citoquinina predominante de *Arabidopsis*, e sua concentração foi reduzida em cerca de 60% nas linhagens de superexpressão em comparação àquela do tipo selvagem (Fig 3G). A maior disponibilidade da proteína nas linhagens de superexpressão pode apresentar um impedimento para o transporte de citoquininas através da membrana de plasma, especialmente por que as citoquininas devem ser translocadas das raízes para o meristema do broto apical. Isto induzirá a um fenótipo de perda de função aparente, a saber, a estatura da planta reduzida e a ausência de biomassa vegetativa, como ob-

servado (Figura 3A).

Ao contrário, nas linhagens antissense, a concentração de isopentenil adenina foi aumentada em acima de 60% em comparação ao tipo selvagem, que corresponde a um aumento maior do que quatro vezes sobre as linhagens de superexpressão (Figura 3G). Isto resultou no fenótipo oposto de ramificação profusa e significativo ganho de biomassa.

Para testar isto experimentalmente, o efeito de aplicação exógena de citoquininas sobre os fenótipos das linhagens transgênicas foi estudado. As linhagens de superexpressão recebendo spray de 0,01 μ M de zeatina ou 0,01 μ M de quinetina em dias alternados do estágio de muda mostrou emergência no estágio de 6 a 7 folhas quando em comparação às linhagens de superexpressão não tratadas, que emergiram no estágio de 4 folhas (Figura 2G, 2H, 2I, 2J e Figura 7). A Arabidopsis do tipo selvagem emergiu em torno do estágio de 8 folhas, indicando que as linhagens de superexpressão foram 'parcialmente resgatadas' pela aplicação exógena de citoquininas.

Além disso, as linhagens de superexpressão antissense não mostraram nenhuma alteração significativa em resposta à aplicação exógena de citoquininas (Figura 7), suportando a visão de que o impedimento à translocação de citoquinina é provável de ser responsável pelos fenótipos contraditórios observados no estudo.

(e) HOG1 purificado não possui atividade de enzima SAHH

Nenhuma diferença significativa em atividades de SAHH nos extratos de proteína brutos (Figura 3H) do tipo selvagem ($2,92 \pm 0,15$ nmol/min/mg proteína), antissense ($2,84 \pm 0,21$ nmol/min/mg proteína) e linhagens de superexpressão ($3,02 \pm 0,19$ nmol/min/mg proteína) a despeito da reportagem anterior de que os mutantes de ponto hog1 tiveram atividades de SAHH ligeiramente menores nos extratos de proteína brutos (Rocha e outros, Plant Cell 17:404-417, 2005) em comparação àquela do tipo selvagem. Mais importantemente, os presentes dados mostraram que a proteína TAP-HOG1 purificada não possui atividade de enzima SAHH (Figura 3H). Estes resultados sugerem que a presente proteína HOG1 pode ser um receptor de citoquinina.

Além disso, foi explicado em Rocha e outros (*supra*) que as menores diferenças em atividade de SAHH avaliada em extratos de proteína brutos do mutante de ponto (*hog1-1*) pode ser dependente de alguns outros locos. Adicionalmente, a redução da atividade de SAHH deve induzir a um aumento nos níveis de SAH e um decréscimo na relação de SAM:SAH. Entretanto, foi mostrado que o homozigoto *hog1-1* mostrou insignificante aumento em níveis de SAH e a mudança na relação de SAM:SAH foi relativamente pequena. A hipometilação ampla de genoma mostrada nestes mutantes foi também em contraste com a hipometilação de genoma de tabaco em culturas de suspensão induzidas por (S)-9-(2,3-dihidroxipropil)adenina, que ocorreu apenas quando a relação de SAM:SAH diminuiu em 300 vezes com relação ao material não tratado. Estes resultados sugeriram que as proteínas de ligação de citoquinina com similaridade de sequência para SAHH em plantas podem não ser enzimas SAHH ativas, porém podem em vez disso ser receptores de citoquinina.

(f) HOG1 afeta a expressão de genes de resposta primária de citoquinina.

Embora a resposta de cultura de tecido suporte a visão de que HOG1 é um regulador positivo de resposta de citoquinina, ele envolveu acima de seis semanas de crescimento *in vitro*, durante aqueles outros processos podem ter também contribuído para o fenótipo. Portanto, a expressão de genes selecionados que são conhecidos estar diretamente induzidos por citoquininas em períodos relativamente curtos foi também examinada (Figura 4A, 4B e Tabela 4). Estes genes incluíram KNAT1 e STM (genes homeobox envolvidos em função de meristema, induzidos em 5 minutos após a aplicação de citoquininas exógenas) bem como ARR4, ARR5 e ARR6 (que são os reguladores de resposta do tipo A induzidos por citoquininas). Análise de PCR de tempo real quantitativa foi realizada usando RNA de mudas do tipo selvagem, linhagens de superexpressão de HOG1 e de supressão antissense de HOG1 antes e após um tratamento de pulso com citoquinina (benziladenina, BA, at 0 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M ou 5 μ M). A extração de RNA foi realizada em tecidos colhidos durante diversos intervalos de tempo (5 min, 15 min, 30 min e 1 h). A aplicação de BA causou um aumento dependente da dose

de transcrições de KNAT1 e STM, que foi comensurado com o nível de expressão de HOG1 e as concentrações de citoquinina endógena nas linhagens (Figura 4A, 4B, Tabela 4). Os níveis de transcrição de KNAT1 e STM foram significativamente superregulados em 6 a 8 vezes mesmo sem tratamento de BA nas linhagens de supressão antissense de HOG1, ao passo que as linhagens não tratadas de superexpressão mostraram um aumento de 4 a 7 vezes destas transcrições quando em comparação ao tipo selvagem não tratado (Figura 4A). Entretanto, dentro de 1h após a aplicação de 5 μ M de BA, as linhagens de superexpressão (por exemplo, OE1 e OE12) não mostraram nenhuma diferença significativa nos níveis de transcrições de KNAT1 e STM em comparação àquelas das plantas do tipo selvagem não tratadas (Figura 4A, Tabela 4). Isto é consistente com a observação de que esta linhagem tem redução em níveis de citoquinina endógena.

Tabela 4. Análise de PCR de tempo real quantitativa de genes responsivos de selecionada:

RNA de mudas de linhagens do tipo selvagem, de superexpressão de HOG1 e de supressão antissense antes e após um tratamento de pulso com citoquinina (benziladenina, BA, at 0 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M ou 5 μ M). Extração de RNA foi realizada usando tecidos colhidos durante diversos intervalos de tempo (5 min, 15 min, 30 min e 1h) de três linhagens de supressão antissense independente (AS1, AS8, AS21) e superexpressão (OE1, OE12, OE18). Os genes analisados incluem KNAT1, STM (genes homeobox envolvidos em função de meristema), ARR4, ARR5 e ARR6 (reguladores de resposta do tipo A induzidos por citoquininas). A aplicação de BA causou um aumento de transcrições de KNAT1 e STM dependente da dose (as setas próximas aos valores de mudança de duplicação indicam a superregulação $\uparrow$ ou sub-regulação $\downarrow$). ARR1, ARR2 (reguladores de resposta do tipo B), AHK2, AHK3, AHK4 (receptores de citoquinina de histidina quinase) foram também analisados. Entretanto, os dados não são mostrados nesta Tabela por causa destes genes exibirem menos do que mudança de duas vezes em expressão.

Gene	Concentração de BA	Tempo	Genótipo/mudança de duplicação						
			Tipo selvagem	AS1	AS8	AS21	OE1	OE12	OE18
KNAT1	0 μM	5 min	1	6,12↑	7,36↑	8,69↑	4,91↓	5,01↓	7,20↓
		15 min	1	6,12↑	7,36↑	8,69↑	4,91↓	5,01↓	7,20↓
		30 min	1	6,12↑	7,36↑	8,69↑	4,91↓	5,01↓	7,20↓
		1 h	1	6,12↑	7,36↑	8,69↑	4,91↓	5,01↓	7,20↓
	0,01 μM	5 min	2,13↑	8,12↑	9,1↑	10,01↑	4,01↓	4,87↓	6,56↓
		15 min	2,67↑	8,57↑	9,21↑	10,39↑	3,86↓	4,56↓	6,32↓
		30 min	2,98↑	8,98↑	9,86↑	10,53↑	3,41↓	4,13↓	6,13↓
		1 h	3,15↑	9,20↑	9,98↑	11,99↑	3,01↓	3,06↓	5,98↓
	0,1 μM	5 min	3,36↑	9,14↑	10,12↑	11,11↑	3,56↓	3,91↓	5,89↓
		15 min	3,58↑	9,39↑	10,32↑	11,26↑	3,24↓	3,71↓	5,72↓
		30 min	3,89↑	9,69↑	10,57↑	11,48↑	3,12↓	3,59↓	5,36↓
		1 h	3,99↑	9,98↑	10,99↑	11,83↑	2,96↓	3,21↓	5,01↓
	1,0 μM	5 min	4,1↑	10,43↑	11,01↑	11,93↑	2,76↓	3,19↓	4,36↓
		15 min	4,31↑	10,68↑	11,43↑	12,02↑	2,51↓	3,01↓	4,21↓
		30 min	4,59↑	10,73↑	11,69↑	12,35↑	2,29↓	2,89↓	4,01↓
		1 h	4,87↑	11,01↑	11,93↑	12,76↑	2,01↓	2,16↓	3,92↓
	5,0 μM	5 min	5,52↑	10,98↑	11,98↑	12,43↑	2,19↓	2,87↓	3,45↓
		15 min	5,69↑	11,01↑	12,07↑	12,54↑	2,01↓	2,62↓	3,18↓
		30 min	5,89↑	11,23↑	12,46↑	12,87↑	1,83↓	2,49↓	3,01↓
		1 h	6,04↑	11,46↑	13,43↑	12,96↑	1,54↓	1,83↓	2,89↓

Gene	Concentração de BA	Tempo	Genótipo/mudança de duplicação						
			Tipo selvagem	AS1	AS8	AS21	OE1	OE12	OE18
ARR4	0 μM	5 min	1	3,12↑	5,36↑	7,69↑	5,91↓	6,01↓	8,2↓
		15 min	1	3,12↑	5,36↑	7,69↑	5,91↓	6,01↓	8,2↓
		30 min	1	3,12↑	5,36↑	7,69↑	5,91↓	6,01↓	8,2↓
		1 h	1	3,12↑	5,36↑	7,69↑	5,91↓	6,01↓	8,2↓
	0,01 μM	5 min	3,13↑	4,12↑	6,1↑	8,01↑	5,01↓	5,87↓	7,56↓
15 min		3,67↑	4,57↑	6,41↑	8,39↑	4,86↓	5,56↓	7,32↓	
30 min		3,98↑	4,98↑	6,86↑	8,53↑	4,41↓	5,13↓	7,13↓	
1 h		4,15↑	5,2↑	6,98↑	8,99↑	4,01↓	4,06↓	6,98↓	
	0,1 μM	5 min	4,36↑	5,14↑	7,12↑	9,11↑	4,56↓	4,91↓	6,89↓
15 min		4,58↑	5,39↑	7,32↑	9,26↑	4,24↓	4,71↓	4,72↓	
30 min		4,89↑	5,69↑	7,57↑	9,48↑	4,12↓	4,59↓	4,36↓	
1 h		4,99↑	5,98↑	7,99↑	9,83↑	3,96↓	4,21↓	4,01↓	
	1,0 μM	5 min	5,1↑	6,43↑	8,01↑	9,93↑	3,76↓	4,19↓	3,36↓
15 min		5,31↑	6,68↑	8,43↑	10,02↑	3,51↓	4,01↓	3,21↓	
30 min		5,59↑	6,73↑	8,69↑	10,35↑	3,29↓	3,89↓	3,01↓	
1 h		5,87↑	7,01↑	8,93↑	70,76↑	3,01↓	3,56↓	2,92↓	
	5,0 μM	5 min	6,52↑	6,98↑	8,98↑	10,43↑	3,19↓	3,87↓	2,45↓
15 min		6,69↑	7,01↑	9,07↑	10,54↑	3,01↓	3,62↓	2,18↓	
30 min		6,89↑	7,23↑	9,46↑	10,87↑	2,83↓	3,49↓	2,01↓	
1 h		7,04↑	7,46↑	9,63↑	10,96↑	2,54↓	2,13↓	1,89↓	

Gene	Concentração de BA	Tempo	Genótipo/mudança de duplicação						
			Tipo selvagem	AS1	AS8	AS21	OE1	OE12	OE18
STM	0 μM	5 min	1	3,01↑	5,24↑	6,56↑	3,56↓	5,21↓	6,59↓
		15 min	1	3,01↑	5,24↑	6,56↑	3,56↓	5,21↓	6,59↓
		30 min	1	3,01↑	5,24↑	6,56↑	3,56↓	5,21↓	6,59↓
		1 h	1	3,01↑	5,24↑	6,56↑	3,56↓	5,21↓	6,59↓
	0,01 μM	5 min	2,45↑	3,23↑	5,2↑	7,1↑	3,41↓	4,97↓	6,23↓
15 min		2,54↑	3,67↑	5,58↑	7,48↑	3,23↓	4,65	6,02↓	
30 min		3,01↑	3,91↑	5,95↑	7,69↑	3,01↓	4,31↓	5,91↓	
1 h		3,2↑	4,1↑	6,06↑	8,05↑	2,81↓	3,96↓	5,82↓	
	0,1 μM	5 min	3,56↑	4,24↑	6,22↑	8,21↑	3,2↓	3,81↓	5,79↓
15 min		3,68↑	4,49↑	6,39↑	8,36↑	3,14↓	3,73↓	5,61↓	
30 min		3,85↑	4,79↑	6,63↑	8,58↑	2,92↓	3,49↓	5,34↓	
1 h		3,96↑	4,97↑	6,94↑	8,87↑	2,76↓	3,01↓	5,01↓	
	1,0 μM	5 min	4,11↑	5,53↑	7,8↑	8,89↑	2,86↓	2,89↓	4,26↓
15 min		4,36↑	5,78↑	7,93↑	9,02↑	2,61↓	2,56↓	4,11↓	
30 min		4,69↑	5,83↑	7,99↑	9,25↑	2,39↓	2,87↓	4,01↓	
1 h		4,97↑	6,21↑	8,07↑	9,66↑	2,11↓	2,62↓	3,82↓	
	5,0 μM	5 min	5,62↑	6,01↑	8,46↑	9,33↑	2,29↓	2,49↓	3,35↓
15 min		5,89↑	6,21↑	8,63↑	9,44↑	2,11↓	2,13↓	3,28↓	
30 min		5,99↑	6,43↑	8,73↑	9,67↑	1,93↓	2,01↓	3,01↓	
1 h		6,14↑	6,76↑	8,99↑	9,89↑	1,44↓	1,68↓	2,79↓	

Gene	Concentração de BA	Tempo	Genótipo/mudança de duplicação						
			Tipo selvagem	AS1	AS8	AS21	OE1	OE12	OE18
ARR5	0 μ M	5 min	1 $\uparrow$	4,11 $\uparrow$	6,34 $\uparrow$	7,63 $\uparrow$	4,66 $\downarrow$	6,31 $\downarrow$	7,49 $\downarrow$
		15 min	1 $\uparrow$	4,11 $\uparrow$	6,34 $\uparrow$	7,63 $\uparrow$	4,66 $\downarrow$	6,31 $\downarrow$	7,49 $\downarrow$
		30 min	1 $\uparrow$	4,11 $\uparrow$	6,34 $\uparrow$	7,63 $\uparrow$	4,66 $\downarrow$	6,31 $\downarrow$	7,49 $\downarrow$
		1 h	1 $\uparrow$	4,11 $\uparrow$	6,34 $\uparrow$	7,63 $\uparrow$	4,66 $\downarrow$	6,31 $\downarrow$	7,49 $\downarrow$
	0,01 μ M	5 min	3,55 $\uparrow$	4,33 $\uparrow$	6,12 $\uparrow$	8,2 $\uparrow$	4,51 $\downarrow$	5,87 $\downarrow$	7,33 $\downarrow$
		15 min	3,64 $\uparrow$	4,77 $\uparrow$	6,68 $\uparrow$	8,58 $\uparrow$	4,33 $\downarrow$	5,55 $\downarrow$	7,03 $\downarrow$
		30 min	4,11 $\uparrow$	5,01 $\uparrow$	6,82 $\uparrow$	8,79 $\uparrow$	4,11 $\downarrow$	5,21 $\downarrow$	6,91 $\downarrow$
		1 h	4,3 $\uparrow$	5,11 $\uparrow$	7,16 $\uparrow$	9,15 $\uparrow$	3,91 $\downarrow$	4,96 $\downarrow$	6,63 $\downarrow$
	0,1 μ M	5 min	4,66 $\uparrow$	5,34 $\uparrow$	7,32 $\uparrow$	9,31 $\uparrow$	4,1 $\downarrow$	4,71 $\downarrow$	6,69 $\downarrow$
		15 min	4,78 $\uparrow$	5,59 $\uparrow$	7,49 $\uparrow$	9,46 $\uparrow$	4,04 $\downarrow$	4,63 $\downarrow$	6,51 $\downarrow$
		30 min	4,95 $\uparrow$	5,89 $\uparrow$	7,73 $\uparrow$	9,68 $\uparrow$	3,9 $\downarrow$	4,4 $\downarrow$	6,23 $\downarrow$
		1 h	5,06 $\uparrow$	6,07 $\uparrow$	8,04 $\uparrow$	9,97 $\uparrow$	3,67 $\downarrow$	4,01 $\downarrow$	6,01 $\downarrow$
	1,0 μ M	5 min	5,21 $\uparrow$	6,62 $\uparrow$	8,59 $\uparrow$	9,99 $\uparrow$	3,96 $\downarrow$	3,99 $\downarrow$	5,36 $\downarrow$
		15 min	5,46 $\uparrow$	6,88 $\uparrow$	8,93 $\uparrow$	10,12 $\uparrow$	3,71 $\downarrow$	3,46 $\downarrow$	5,21 $\downarrow$
		30 min	5,79 $\uparrow$	6,93 $\uparrow$	9,09 $\uparrow$	10,35 $\uparrow$	3,49 $\downarrow$	3,77 $\downarrow$	5,01 $\downarrow$
		1 h	6,07 $\uparrow$	7,31 $\uparrow$	9,17 $\uparrow$	10,76 $\uparrow$	3,21 $\downarrow$	3,52 $\downarrow$	4,72 $\downarrow$
	5,0 μ M	5 min	6,72 $\uparrow$	7,01 $\uparrow$	9,56 $\uparrow$	10,43 $\uparrow$	3,19 $\downarrow$	3,59 $\downarrow$	4,25 $\downarrow$
		15 min	6,99 $\uparrow$	7,31 $\uparrow$	9,73 $\uparrow$	10,56 $\uparrow$	3,01 $\downarrow$	3,13 $\downarrow$	4,18 $\downarrow$
		30 min	7,09v	7,53 $\uparrow$	9,83 $\uparrow$	10,71 $\uparrow$	2,83 $\downarrow$	3 $\downarrow$	4 $\downarrow$
		1 h	7,24 $\uparrow$	7,86 $\uparrow$	10,05 $\uparrow$	10,93 $\uparrow$	2,54 $\downarrow$	2,78 $\downarrow$	3,89 $\downarrow$

Gene	Concentração de BA	Tempo	Genótipo/mudança de duplicação						
			Tipo selvagem	AS1	AS8	AS21	OE1	OE12	OE18
ARR6	0 μM	5 min	1↑	4,12↑	6,36↑	8,63↑	5,66↓	7,01↓	9,2↓
		15 min	1↑	4,12↑	6,36↑	8,63↑	5,66↓	7,01↓	9,2↓
		30 min	1↑	4,12↑	6,36↑	8,63↑	5,66↓	7,01↓	9,2↓
		1 h	1↑	4,12↑	6,36↑	8,63↑	5,66↓	7,01↓	9,2↓
	0,01 μM	5 min	4,13↑	4,12↑	7,1↑	9,2↑	5,51↓	6,87↓	8,56↓
		15 min	4,67↑	4,57↑	7,41↑	9,58↑	5,33↓	6,56↓	8,32↓
		30 min	4,98↑	5,98↑	7,86↑	9,79↑	5,11↓	6,13↓	8,13↓
		1 h	5,15↑	6,2↑	7,98↑	10,15↑	4,91↓	5,06↓	7,98↓
	0,1 μM	5 min	5,36↑	6,14↑	8,12↑	10,31↑	5,1↓	5,91↓	7,89↓
		15 min	5,58↑	6,39↑	8,32↑	10,46↑	5,04↓	5,71↓	5,72↓
		30 min	5,89↑	6,69↑	8,57↑	10,68↑	4,9↓	5,59↓	5,36↓
		1 h	5,99↑	6,98↑	8,99↑	10,97↑	4,67↓	4,61↓	5,01↓
	1,0 μM	5 min	6,1↑	7,43↑	9,01↑	10,99↑	4,96↓	5,19↓	4,36↓
		15 min	6,31↑	7,68↑	9,43↑	11,12↑	4,71↓	5,01↓	4,21↓
		30 min	6,59↑	7,73↑	9,69↑	11,32↑	4,49↓	4,89↓	4,01↓
		1 h	6,87↑	8,01↑	9,93↑	11,76↑	3,21↓	3,56↓	3,01↓
	5,0 μM	5 min	7,52↑	7,98↑	9,98↑	11,43↑	4,19↓	4,87↓	3,45↓
		15 min	7,69↑	8,01↑	10,07↑	11,56↑	4,01↓	4,62↓	3,18↓
		30 min	7,89↑	8,23↑	10,46↑	11,71↑	3,83↓	3,49↓	3,01↓
		1 h	8,04↑	8,46↑	10,63↑	11,93↑	2,14↓	2,03↓	2,89↓

O nível de expressão dos genes examinados foi de 3 a 6 vezes maior nas linhagens de antissense que têm concentração de citoquininas endógenas de cerca de 4 vezes maior. Portanto, a expressão de HOG1 foi mostrada correlacionar-se à resposta de citoquinina nestas plantas. Isto é similar aos relatos anteriores de que ambas as expressões STM e KNAT1 foram significativamente elevadas em plantas de *Arabidopsis* com biossíntese de citoquinina elevada causada por superexpressão do gene bacterial *ipt* (Rupp e outros, *Plant J* 18:557-563, 1999). Estas observações indicam o envolvimento direto de HOG1 em regulação de respostas de citoquinina durante o desenvolvimento da planta.

Adicionalmente, para determinar se os fenótipos das linhagens transgênicas de HOG1 foram associados com a transdução de sinal de citoquinina, a classe melhor conhecida de genes precoces imediatos induzidos por citoquininas, a saber, genes ARR tipo A - ARR4, ARR5 e ARR6 foram estudados (Figura 4B). Os presentes dados mostraram que estes genes foram super-regulados em minutos após um único tratamento de pulso de citoquinina, que é consistente com observações anteriores em *Arabidopsis* (Brandstatter e Kieber *planta Cell* 10:1009-1020, 1998; D'Agostino et al *planta Physiol* 124:1706-1717, 2000; Taniguchi e outros, *FEBS Lett.* 429:259-262, 1998; To e outros, *planta Cell* 16:658-671, 2004).

Descobriu-se que as linhagens de HOG1 de superexpressão (por exemplo, OE12), que têm uma redução significativa nos níveis de citoquinina endógena (Figura 3G), mostraram um decréscimo de 3 a 9 vezes nos níveis de expressão dos três genes ARR tipo A. Isto pode ser superado em uma grande extensão por um tratamento de BA (Figura 4B), que é consistente com o fluxo reduzido através da trilha de transdução de sinal de citoquinina primária. Similarmente, as linhagens de HOG1 antissense (por exemplo, AS8) com níveis de citoquinina endógena maiores tiveram um nível correspondentemente maior (um aumento de 4 a 9 vezes) de expressão de ARR (Figura 4B e Tabela 4). Estes dados mostram que os genes de ARR tipo A são a jusante do novo receptor de citoquinina HOG1. Similarmente, ARR6 foi previamente mostrado ser induzido em resposta às citoquininas

exógenas em linhagens de superexpressão de CRE1, o que confirmou ARR6 ser um receptor de citoquinina (Hwang e Sheen *Nature* 413:383-389, 2001).

Além disso, os níveis de transcrição de dois ARRs tipo B (ARR1 e ARR2) nestas linhagens transgênicas foram estudados para assegurar que as observações sobre os ARRs tipo A são respostas específicas. ARR1 e ARR2 não foram significativamente afetados pelo tratamento de BA sob as condições experimentais presentes (Tabela 4), que é consistente com resultados anteriores (Imamura e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2691-2696, 1998; Kiba e outros, *Plant Cell Physiol.* 40:767-771, 1999; Hutchison e outros, *Plant Cell* 18:3073-3087, 2006).

A fim de excluir o envolvimento de receptores de citoquinina do tipo AHK, a saber, AHK2, AHK3 e CRE1/AHK4, seus níveis de transcrição nas diferentes linhagens transgênicas foram determinados. Nenhuma diferença significativa foi observada nas linhagens de superexpressão e supressão de antissense de HOG1 em comparação àquela do tipo selvagem (dados não mostrados), mostrando que HOG1 age independentemente destes três receptores de citoquinina conhecidos.

(g) TAP-HOG1 interage com AHP1

Para determinar o complexo de sinalização formado pela proteína HOG1 e também sustentar seu papel como um receptor de citoquinina, proteínas que interagem com HOG1 foram isoladas e identificadas.

Seis linhagens de *Arabidopsis* transgênicas independentes expressando HOG1 com um rótulo TAP de terminal N (TAP-HOG1) foram geradas. Estas plantas tiveram o mesmo fenótipo como as linhagens de superexpressão de HOG1, mostrando que a proteína de fusão é funcional nas plantas. Ensaio destrutivo foi realizado com extrato de proteína total de plantas transgênicas TAP-HOG1 com três semanas de idade. Uma faixa de proteína de 71 kDa foi detectada quando uma análise de imunoblot foi realizada usando anticorpo PAP para detectar a presença da proteína de fusão TAP-HOG1 nestas plantas (Figura 4C). O peso molecular previsto de HOG1 é de 56 kDa e o rótulo é de 15 kDa, desse modo montando na faixa

de proteína de fusão de 71 kDa. O complexo de proteína com TAP-HOG1 foi eluído de extrato de proteína total usando os rótulos e contas de IgG usando o método de Forler e outros, (*supra*). O complexo de proteína foi submetido à SDS-PAGE e sequenciamento de terminal N da faixa de proteína promi-

5 nente revelou que ele era AHP1. Subsequentemente, o cDNA para AHP1 foi clonado por PCR de *Arabidopsis* e AHP1 recombinante foi expresso em *E. coli* (Figura 4D). Foi mostrado, usando ITC, que AHP1 interage diretamente com proteína TAP-HOG1 purificada (Fig 4E). O valor KD de constante de dissociação para o complexo formado por duas proteínas purificadas em ITC

10 foi de 23,8 nM.

Proteínas de Fosfotransferência Histidina de *Arabidopsis* (AHP1, AHP2, AHP3, AHP4 e AHP5) são os intermediários-chave de sinalização de citoquinina, por que elas funcionam como pontes nucleares citoplásmicas entre os receptores de membrana e os reguladores de resposta nuclear. A

15 demonstração de que elas interagem com AHP1, que é um intermediário-chave de transdução de sinal de citoquinina, também confirmou a função de receptor da proteína HOG1.

Os presentes dados mostram que HOG1 é um novo receptor de citocinina em adição aos receptores da família AHK descritos mais cedo.

20 Diversos homólogos foram isolados de *Brassica alboglabra*, crisântemo, amarantos e arroz. Isto mostra que HOG1 está presente em diversas espécies de planta e é importante na regulação de desenvolvimento de planta. A série de reação de transdução de sinal de citocinina descrita acima é uma série de reação de fosforrevezamento similar ao sistema de resposta de dois

25 componentes bacterianos. Isto é compatível com o fato de que citocininas desempenham diversos papéis na regulação de desenvolvimento de planta e a presença de mais do que um tipo de receptores de citocinina pode facilitar tais funções pleiotrópicas. Um tal fenômeno foi também observado em transdução de sinal de etileno onde mais do que um receptor (por exemplo,

30 ETR1, ERS2, ETR2 e EIN4) está envolvido. Além disso, a expressão constitutiva de HOG1 em todas as partes da planta sugere uma papel crucial para a proteína em desenvolvimento de planta.

A possibilidade que outros receptores podem existir para citocininas foi realçada com base na observação de que o mutante triplo dos receptores de citocinina de histidina cinase (*cre1-12ahk3-3ahk2-2(Col)*) produziu plantas, embora tendo fenótipos severamente nanicos e estéreis. Mutantes de perda de função nos três receptores de citocinina tipo AHK causaram fenótipos opostos em comparação àqueles observados com a presente supressão antissentido do gene *HOG1*. Os fenótipos contraditórios observados no presente estudo parecem ser o resultado de níveis de citocinina endógenos alterados nos brotos. A ligação de alta afinidade de moléculas de citocinina pela proteína *HOG1* foi indicada por valores KD baixos. Quando o gene foi significativamente superexpresso por duas cópias do promotor forte (promotor 35S de vírus de mosaico de couve-flor) usado no presente estudo, o aumento resultante na proteína bem como expressão ectópica levou a uma redução significativa em citocininas livres disponíveis (Figura 3G). Isto é possivelmente devido à proteína que age como um impedimento para transportar citocinina através da membrana plasmática. Isto é importante porque o ápice do broto deve receber citocininas do ápice da raiz (que é o sítio primário de biossíntese de citocinina). Isto levou a um fenótipo de perda de função aparente, isto é, estatura da planta reduzida e falta de biomassa vegetativa.

Ao contrário, nas plantas de antissentido, existe um aumento significativo em moléculas de citocinina livres disponíveis no meristema apical do broto, levando ao fenótipo oposto de ramificação profusa e ganho significativo de biomassa (Figura 3G).

Aplicação da purificação de proteína rótulo TAP em plantas permitiu a caracterização de diversos complexos de proteína incluindo a proteína de resistência Cf9 em tabaco e proteína de CTR1 em *Arabidopsis*. O presente estudo identificou fosfotransferência de histidina de *Arabidopsis* (AHP1) como uma proteína que interage com *HOG1*, mostrando que AHP1 é um intermediário de sinalização a jusante para *HOG1*. AHP1 recombinante foi expressa e mostrada interagir diretamente com a proteína TAP-*HOG1* purificada. O valor da constante de dissociação para o complexo formado pelas duas proteínas puras em ITC foi 23,8 nM, que fornece importante su-

porte para a função do de HOG1.

(h) HOG1 como um novo receptor para série de reação de transdução de sinal de citocinina

Para melhor entender o papel do novo receptor de citocinina
 5 HOG1 na mediação de resposta de citocinina, os genes de resposta primária induzidos por citocininas a saber, genes ARR tipo A (isto é ARR4, ARR5 e ARR6) foram analisados. Mudanças nos níveis de expressão dos ARRs foram observadas na Figura 4B e Tabela 4, que em adição ao teor de citocinina medido em linhagens de superexpressão e antissentido de HOG1 sugerem que a resposta à citocinina endógena é afetada por HOG1. Isto confirma
 10 a proteína HOG1 como um novo receptor e os ARRs como os membros da cascata de sinalização a jusante da série de reação de transdução de sinal de citocinina de HOG1 junto com AHP1.

Portanto, os presentes dados fornecem uma série de reação de
 15 transdução de sinal de citocinina por meio de HOG1 em *Arabidopsis* em adição ao sistema de dois componentes previamente descrito (Figura 5). É importante observar que modificação genética dos receptores de histidina cinase relatados mais cedo não foi mostrada afetar o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo ao contrário da supressão antissentido de HOG1. Os pre-
 20 sentes dados mostram que este receptor servirá como um alvo-chave para melhora biotecnológica de plantas de colheita para produção aumentada de biomassa e grão.

EXEMPLO 2

Aumento de produção de grão e biomassa em arroz por supressão antissen-
 25 tido de um gene para um receptor de citocinina putativo

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais da planta

Para arroz *Oryza sativa* L. *japonica*, cultivar Nipponb foram usa-
 dos. Este é um cultivar comercial que se origina do Japão. Trabalho similar
 30 pode também ser realizado com outros cultivares de arroz (subespécies *indica*). Sementes de *Arabidopsis thaliana* tipo selvagem foram obtidas de LEHLE SEEDS (1102 South Industrial Blvd., Suite D, Round Rock TX 78681

USA).

Cepas bacterianas

A cepa bacteriana usada para clonagem de DNA neste estudo foi *Escherichia coli* DH5 α , que foi cultivada em meio LB líquido (Sambrook e outro, 1989) a 37°C exceto quando indicado de outra maneira. As cepas de *Agrobacterium tumefaciens* usadas foram GV3101 (Koncz e Schell, 1986).

PCR com iniciadores degenerados para clonagem do gene

Após extração de RNA, transcrição reversa (RT) foi realizada usando transcriptase reversa AMV (vírus de mieloblastose aviária) (AMV-RT, Promega). Os produtos de cDNA foram usados para PCR usando os iniciadores degenerados PET1: 5'-A(AG)ATGCC(CT)GG(ACT)CT(ACT)ATG(GT)C(ACT)T-3' (SEQ ID NO: 24) e PET2: 5'-TC(AG)AACTTGCTCTTGGT(AG)AC(AG)-3' (SEQ ID NO: 25) para isolar o fragmento parcial de *Arabidopsis thaliana* e arroz. O fragmento de PCR foi clonado e sequenciado.

Amplificação rápida de extremidades de cDNA 5' e 3'

O Kit de Amplificação de cDNA SMARTTM RACE (Clontech Laboratories) foi usado para identificar as seqüências finais 5'- e 3'-cDNA (5'/3'-RACE) de cDNA. Estes produtos de PCR foram sequenciados. A sequência parcial e produtos de PCR RACE foram alinhados juntos para obter a sequência de cDNA de tamanho natural para *Arabidopsis thaliana* (HOG1) e arroz (OsCBP).

O constructo de gene usado para transformação de planta mediada por *Agrobacterium* foi o constructo de supressão de gene antissentido (35S:asHOG1). O promotor usado foi o promotor 35S de Vírus Mosaico da Couve-flor (CaMV).

Transformação de planta mediada por *Agrobacterium* de arroz

O método de Hiei e outro, (*Plant Journal* UK Vol. 6, páginas 271–282, 1994) foi usado.

1. Indução de calo de arroz

Sementes de arroz maduras foram esterilizadas na superfície com 70% de etanol durante 1,5 min. Branqueador (20%) foi adicionado com

uma gota de Tween-20, em um frasco estéril de 100 ml em um agitador a 120 rpm durante 45 min. Isto foi seguido por enxague das sementes tratadas completamente com água destilada estéril.

As sementes esterilizadas foram colocadas na superfície de
 5 meio NB0 solidificado de 30 ml com 2,0 mg/l de 2,4-D (meio de indução de calo) em placas Petri plásticas profundas de 9 cm estéreis. As placas foram cobertas com fita e colocadas em uma caixa em uma sala de cultura de tecido e as sementes de arroz foram deixadas germinar a 25°C na escuridão.

Após 10 dias, os calos derivados do *scutellum* foram excisados e
 10 subcultivados em meio de indução de calo fresco. A subcultura foi realizada a cada 4 semanas até calos embriogênicos, amarelo-claro, de desenvolvimento vigoroso serem obtidos.

2. Cocultivo de *Agrobacterium* com calo de arroz

Plasmídeos binários contendo um constructo antissentido (base-
 15 ado em pCAMBIA1301, R. Jefferson, CAMBIA, Austrália) foram introduzidos em cepa AGL1 de *A. tumefaciens*. A *A. tumefaciens* foi cultivada em armazenagem em meio YEP solidificado com 10 mg/L de rifampicina, 50 mg/L de canamicina e 50 mg/L de higromicina a 28°C durante 48-73 horas. 1 ml da cultura bacteriana foi adicionado a 100 ml de meio AB contendo os mesmos
 20 antibióticos seletivos em um frasco de 250 ml a 28°C. As bactérias foram cultivadas para obter uma densidade de OD595 em 0,8-1,0. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 4.000 rpm durante 10 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi em seguida removido e as bactérias foram lavadas uma vez por ressuspensão do pélete no mesmo volume em
 25 meio AMM, e centrifugadas novamente em 4.000 pm durante 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado.

As bactérias foram diluídas com meio AMM para uma densidade de OD595 em 0,4 (cerca de: 109 células por ml). Cerca de 20-25 ml das bactérias diluídas foram usados para inoculação de *Agrobacterium* em placas
 30 Petri plásticas de 9 cm estéreis. Calos embriogênicos, amarelo-claro, de desenvolvimento vigoroso com o tamanho de cerca de 5 mm em diâmetro foram selecionados e colocados na suspensão bacteriana e imersos durante

30 minutos, com agitação ocasional, em uma tampa de fluxo laminar estéril. Suspensão bacteriana em excesso dos calos foi removida colocando-se os calos em uma almofada de papel de tecido estéril seco. Os calos inoculados foram transferidos (sem enxague) para o meio 2N6-AS em placas Petri plásticas de 9 cm estéreis, e incubados a 25°C na escuridão durante 2-3 dias.

3. Seleção e regeneração de transformantes

Os calos cocultivados em um frasco estéril de 100 ml foram coletados e lavados com agitação suave usando 50 - 75 ml de água destilada estéril pelo menos 10 vezes. Os calos foram secados em uma almofada de papel de tecido estéril para remover água de superfície em excesso. Os pedaços de calo foram transferidos em 100 ml de água destilada estéril com 500 mg/l de cefotaxima e 200 mg/l de ampicilina, e agitados durante duas horas em 120 rpm a 25°C. A água foi removida e os pedaços de calo foram manchados e secados em uma almofada de papel estéril. Os pedaços de calo foram transferidos para meio NB0 com 2 mg/L de 2,4-D, 250 mg/l de cefotaxima, 200mg/l de ampicilina, e 50 mg/l de higromicina (meio seletivo) em placas Petri de 9 cm estéreis para a seleção de células transformadas. As placas seladas foram incubadas a 25°C na escuridão.

Após uma seleção de 4 semanas, os microcalos resistentes à higromicina putativos foram extraídos de calos cocultivados, transferidos para o mesmo meio fresco seletivo para confirmação de resistência e proliferação de tecido, e cultivados durante 3 semanas.

Calos resistentes à higromicina em desenvolvimento vigoroso foram transferidos para meio NB0 com 1,0 mg/l de 6-BA, 2,0 mg/l de NAA, 5,0 mg/l de ABA e 50 mg/l de higromicina (meio de pré-regeneração) e cultivados a 25°C na escuridão durante 3 semanas. Os calos embriogênicos resistentes à higromicina compactos brancos do meio de pré-regeneração foram transferidos para meio NB0 com 2,0 mg/l de 6-BA, 1,0 mg/l de IAA, 1,0 mg/l de NAA, 1,0 mg/l de KT e 50 mg/l de higromicina (meio de regeneração), e cultivados a 25°C com 14 horas de luz (cerca de 2000 lux) e 8 horas de escuridão.

As mudas resistentes à higromicina regeneradas foram transfe-

ridas três semanas depois para 100 ml de meio $\frac{1}{2}$ MS com 50 mg/l de higromicina (meio de crescimento de muda) em vasos Phytakon para indução de broto e alongamento de raiz. As condições de cultura foram continuadas até as mudas alcançarem o topo dos recipientes. Mudanças resistentes à higromicina bem desenvolvidas foram removidas dos vasos de cultura e imediatamente colocadas em água de torneira em uma bandeja plástica para remover o meio ligado. As mudas foram transferidas para uma bandeja plástica de 54 poços (cerca de 5 cm de diâmetro) contendo meio $\frac{1}{2}$ MS (solução). Cada grupo dado de mudas (linhagem transgênica putativa) foi colocado em um poço separado. As mudas foram dirigidas durante 7-10 dias em uma câmara de desenvolvimento em 90% de umidade a 20°C com 14 horas de luz (cerca de 400 lux) e 8 horas de escuridão.

As plantas foram transplantadas para o solo em potes e cultivadas em uma estufa como plantas não transgênicas durante três gerações para obter plantas transgênicas homozigotas.

Métodos Suplementares

Materiais de planta e condições de desenvolvimento

Para *Arabidopsis thaliana*, o ecotipo Columbia foi usado e as plantas foram cultivadas em 16 horas de luz e 8 horas de escuridão a 22°C em câmaras de desenvolvimento. *Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*, cultivar Nipponb são usados para experimentos de transformação genética de arroz.

Construção de plasmídeo e transformação genética de *Arabidopsis*

cDNA de HOG1 de tamanho natural foi amplificado por estratégia RACE 5' e 3'. Vetor binário pGreen 0229 (Yu e outros, *supra*) foi usado para todos os constructos de transgene. Para supressão antissense, um fragmento de 850 bp de HOG1 abrangendo as duas assinaturas de SAHH foi usado (SEQ ID NO: 15). A estrutura de leitura aberta completa de cDNA de HOG1 foi usada para o constructo de superexpressão (SEQ ID NO: 2). HOG1 rotulado por TAP foi com rótulos de peptídeo de ligação de Prot A e calmodulina com um sítio de clivagem de TEV entre os dois rótulos. Os constructos foram introduzidos em *Arabidopsis thaliana* por método de imersão floral mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (Clough, S. e Bent, A.

The Plant Journal 16(6):735-743 (1998)) .

Análise de PCR quantitativa de tempo real

RNA total foi extraído de mudas de *Arabidopsis* ou folhas de arroz com o método TRIzol (Invitrogen). RNA total (0,5 µg) tratado com DNaseI livre de RNase foi usado para cada reação de PCR quantitativa realizada com o *kit* RT de uma etapa (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. PCR de tempo real quantitativa foi realizada usando verde SYBR (Applied Biosystems Inc.). Os valores Ct foram normalizados em comparação ao valor de *Tubulin2* Ct para cálculo de duplicação-mudança de acordo com o protocolo do fabricante.

Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Afinidade de ligação de citoquinina e análise termodinâmica da interação entre HOG1 e citoquininas foi examinada por ITC (MCSITC, Microcal, Northampton, USA). Proteína de fusão de TAP-HOG1 foi purificada usando protocolos publicados (Forler e outros, *supra*) de plantas *Arabidopsis* transgênicas abrigando a construção de 35S::TAP-HOG1. 0,01 µM de benzi-ladenina (uma citoquinina de ocorrência natural) e 0,1 µM de proteína TAP-HOG1 purificada foram usados para cada ensaio ITC com 25 injeções (cada injeção de 2 µl em intervalos de 3 s a 37°C). Os dados foram analisados com MICROCAL ORIGIN versão 2.9 usando o método de mínimos quadrados não linear, de melhor ajuste para um sítio de ligação. A estequiometria de ligação (n), e constante de associação (KA) foram calculadas das curvas ajustadas. Subsequentemente, KD foi calculada como 1/KA.

Teor de citoquinina

Citoquininas foram extraídas de plantas inteiras com 100% de metanol e quantificadas usando *kit* de detecção de isopentenil adenosina (Sigma) como descrito em Yang e outros, (*supra*).

Indução de calo de arroz

Sementes de arroz descascadas e esterilizadas na superfície foram induzidas para produção de calo colocando-as em meio NBO suplementado com 2 mg/L de 2,4-D (meio de indução de calo) e em seguida incubando-as a 25°C durante 30 dias no escuro. Após 30 dias, outra subcultura

dos calos emergentes foi feita até calos embriônicos friáveis serem obtidos.

Cocultivo de *Agrobacterium* com calo de arroz

O plasmídeo binário pCAMBIA 1300 contendo o HOG1 de tamanho natural (orientações de senso ou antissense para superexpressão e supressão de antissense, respectivamente) foi introduzido em *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 por eletroporação usando o Porador de Célula GIBCO-BRL. Plasmídeos transformados foram confirmados por digestão de restrição. O *Agrobacterium* abrigando as construções de plasmídeo foi cultivado em meio YEP com 10 mg/l de carbenicilina, 50 mg/l de canamicina e 50 mg/l de higromicina e incubado a 25°C durante 48 h. 1 ml desta cultura de escala pequena foi inoculado em 100 ml de meio líquido AB com os mesmos antibióticos de seleção e incubado a 25°C até as culturas alcançarem uma OD595 de 0,8 a 0,9. A cultura foi centrifugada em 4000 rpm durante 10 min. O pélete bacteriano foi suspenso com meio AMM para uma densidade de OD595 em 0,4. Vinte a 25 ml desta suspensão bacteriana foram vertidos em placas Petri profundas de 9 cm e calos embriogênicos friáveis amarelo-claro de desenvolvimento vigoroso (cerca de 5 mm em tamanho) foram imersos durante 30 min com agitação ocasional. A suspensão bacteriana em excesso foi removida dos calos colocando-a em uma almofada estéril de papel de tecido seco. Subsequentemente, os calos inoculados foram cultivados em meio 2N6-AS em placas Petri profundas de 9 cm estéreis e incubados a 25°C no escuro durante 2-3 dias.

Seleção e regeneração de transformantes de arroz

Calos cocultivados foram lavados pelo menos dez vezes com agitação suave usando 50-75 ml de água estéril, e secados colocando-se sobre papel de tecido estéril. Pedacos de calo foram transferidos para meio NBO com 2 mg/l de 2,4-D, 250 mg/l de cefotaxima e 50 mg/l de higromicina em placas Petri estéreis para seleção. Após 4 semanas de seleção, microcalos resistentes à higromicina foram selecionados como calos transgênicos putativos, excisados do calo cocultivado, transferidos para meio de seleção fresco para outra proliferação, e cultivados durante 3 semanas. Calos resistentes à higromicina de desenvolvimento vigoroso foram transferidos para

meio NBO com 1 mg/l de BA, 2 mg/l de NAA, 5 mg/l de ABA e 50 mg/l de higromicina (meio de pré-regeneração) e cultivados a 25°C no escuro durante 3 semanas. Calos resistentes à higromicina compactos brancos de meio de pré-regeneração foram transferidos para meio NBO com 2 mg/l de BA, 1 mg/l de IAA, 1 mg/l de NAA, 1 mg/l de quinetina e 50 mg/l de higromicina (meio de regeneração) e cultivados a 25°C com um fotoperíodo de 14 horas de luz (25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Após 3 semanas, as mudas resistentes à higromicina regeneradas, incluindo os calos ligados, foram transferidos para 100 ml de meio ½ MS com 50 mg/l de higromicina (meio de muda) em vasos Phytakon para desenvolvimento de broto e alongamento de raiz. As mudas foram cultivadas até elas alcançarem o topo dos recipientes. Cada grupo de mudas foi transferido para uma única poço em uma bandeja plástica de 54 poços contendo solução ½ MS. As mudas foram aclimatizadas durante 7-10 dias em uma câmara de desenvolvimento em 90% de umidade relativa a 20°C com um fotoperíodo de 14 horas de luz (25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Depois as plantas foram transferidas para o solo em potes.

As plantas de arroz transgênicas obtidas dos calos foram designadas geração T0, sementes obtidas de plantas individuais foram germinadas na presença de higromicina e as plantas sobreviventes foram designadas geração T1. Sementes das plantas T1 foram novamente submetidas à seleção de higromicina e foram designadas geração T2 no presente estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise de PCR de tempo real quantitativa indicou que HOG1 é constitutivamente expresso em Arabidopsis, com níveis relativamente maiores nas folhas e tronco de inflorescência como descrito no Exemplo 1(c), sugerindo que HOG1 pode desempenhar um papel fundamental na regulação de desenvolvimento de planta. HOG1 purificado mostrou ligação de alta afinidade às moléculas de citoquinina (zeatina, benziladenina e isopentenil adenina) como descrito no Exemplo 1(a).

A constante de dissociação (KD) para benziladenina foi 20,6 nM (Figura 11), sugerindo ligação de alta afinidade com a proteína HOG1.

Várias linhagens OE de Arabidopsis de HOG1 mostraram um

aumento de 5 a 8 vezes (Figura 8e) em níveis de transcrição de HOG1, enquanto as linhagens AS de *Arabidopsis* mostraram uma supressão de 6 a 10 vezes (Figura 8e) quando em comparação ao tipo selvagem. Expressão de transgene significativamente afetou o desenvolvimento da planta e exibiu

5 fenótipos compatíveis em diversas linhagens transgênicas independentes. Os fenótipos foram registrados de 28 linhagens transgênicas de OE independentes e 21 linhagens AS, indicando que as mudanças foram causadas pelo produto de gene introduzido. Em comparação ao tipo selvagem (WT), germinação de semente ocorreu 4 a 5 dias mais cedo nas linhagens OE, e

10 quase 5 dias depois nas linhagens AS (Tabela 5). Entretanto, retardo de desenvolvimento significativo foi perceptível logo após germinação das linhagens OE enquanto as linhagens AS não mostraram nenhum retardo de desenvolvimento de broto a despeito de germinação de semente retardada.

A formação e expansão de novas folhas de roseta foram retardadas e limitadas em todo desenvolvimento vegetativo nas linhagens OE.

15 Início precoce de florescimento foi observado em plantas OE com disparo no estágio de roseta de 4 folhas (Figura 8a e Tabela 5), quando em comparação às linhagens WT e AS, que tiveram pelo menos 8 e 14 folhas, respectivamente, no momento de disparo (Figura 8b e Tabela 5).

20 Tabela 5. Germinação de semente, início de florescimento e senescência:

Cinco linhagens independentes foram usadas para cada observação. Para cada linhagem, os dados representam a média de três replicatas independentes. As linhagens antissense mostraram germinação tardia, disparo tardio e senescência retardada.

Genótipo da planta	Germinação da semente (número de dias)	Início de florescimento/bloqueio (Número de folhas de roseta)	Senescência (Número de dias)
Tipo selvagem			
1	8	8	40
2	7	8	40
3	8	8	38
4	9	7	40
5	8	8	40

Genótipo da planta	Germinação da semente (número de dias)	Início de florescimento/bloqueio (Número de folhas de roseta)	Senescência (Número de dias)
Média	8	8	40
Linhagens antissense			
AS1	13	14	55
AS8	12	15	53
AS14	13	14	54
AS21	14	14	54
AS19	13	15	53
Média	13	14	54
Linhagens de superexpressão			
OE1	4	4	30
OE8	4	3	32
OE12	4	3	30
OE18	5	4	28
OE14	4	4	30
Média	4	4	30

Após iniciação de florescimento, as linhagens OE não mostraram qualquer outro aumento em biomassa de folha e nenhum galho de inflorescência de eixo foi formado mesmo após 30 dias de desenvolvimento quando a senescência estabeleceu-se para estas linhagens (Figura 8b). Entretanto, as linhagens AS mostraram ramificação profusa de troncos de inflorescência (Figura 8b) e senescência retardada. As linhagens AS tiveram a área da folha mais alta ($2,9 \pm 0,1 \text{ cm}^2$ por folha) e foi significativamente menor nas linhagens OE ($0,4 \pm 0,1 \text{ cm}^2$) e WT ($1,0 \pm 0,1 \text{ cm}^2$) (Figura 8c e Tabela 7). A biomassa total da planta, tamanho da siliqua e como um resultado, o número e peso das sementes por siliqua (Fig 8c, 8d, 8f e Tabela 6) foram reduzidos drasticamente nas linhagens OE, enquanto eles foram significativamente maiores nas linhagens AS em comparação às WT (Figura 8c, 8d, 8f). As linhagens OE senesceram cerca de 10 dias mais cedo, enquanto as linhagens AS senesceram duas semanas mais tarde do que as WT (Figura 8a, 8b e Tabela 6).

Tabela 6. Área da folha, peso de semente e número de sementes por siliqua:

Os dados representam a média $\pm$ SD de três replicatas independentes. Cinco linhagens independentes foram usadas em cada caso. As linhagens antissense mostraram um aumento de três vezes em biomassa de folha e um aumento de duas vezes em produção de semente em comparação ao tipo selvagem.

5

Genótipo da planta	Área da folha (cm ²)	Peso de semente por siliqua (mg)	Número de sementes por siliqua
<i>Arabidopsis</i> tipo selvagem (WT)			
1	1,04 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,01	35 $\pm$ 0,01
2	1,01 $\pm$ 0,01	1,01 $\pm$ 0,02	30 $\pm$ 0,02
3	0,90 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,02	26 $\pm$ 0,01
4	1,07 $\pm$ 0,02	1,18 $\pm$ 0,01	32 $\pm$ 0,01
5	0,98 $\pm$ 0,01	1,10 $\pm$ 0,01	29 $\pm$ 0,01
Média $\pm$ Desvio Padrão	1,00 $\pm$ 0,07	1,06 $\pm$ 0,11	30,40 $\pm$ 0,36
Linhagens antissense			
AS1	2,86 $\pm$ 0,01	1,79 $\pm$ 0,01	54 $\pm$ 0,02
AS8	3,12 $\pm$ 0,01	2,40 $\pm$ 0,02	63 $\pm$ 0,02
AS14	3,01 $\pm$ 0,02	1,96 $\pm$ 0,01	59 $\pm$ 0,02
AS21	2,79 $\pm$ 0,02	1,96 $\pm$ 0,01	57 $\pm$ 0,01
AS19	2,99 $\pm$ 0,02	2,00 $\pm$ 0,02	60 $\pm$ 0,01
Média $\pm$ Desvio Padrão	2,95 $\pm$ 0,13	2,02 $\pm$ 0,22	58,60 $\pm$ 0,37
Linhagens de superexpressão			
OE1	0,33 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,02	15 $\pm$ 0,01
OE8	0,40 $\pm$ 0,02	0,72 $\pm$ 0,01	17 $\pm$ 0,01
OE12	0,49 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,01	19 $\pm$ 0,02
OE18	0,33 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,02	14 $\pm$ 0,02
OE14	0,40 $\pm$ 0,01	0,83 $\pm$ 0,01	17 $\pm$ 0,02
Média $\pm$ Desvio Padrão	0,39 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,07	16,40 $\pm$ 0,14

O teor de citoquinina endógeno foi determinado para três linhagens independentes cada de linhagens WT, OE e AS, por causa da ligação estabelecida entre ramificação e senescência com níveis de citoquinina em plantas. Isopentenil adenina foi a citoquinina predominante e sua concentração foi reduzida em cerca de 60% nas linhagens OE em comparação às WT

10

(Figura 8f). Esta pode ser a principal razão para a biomassa e estatura da planta reduzidas nas linhagens OE observadas nas Figuras 8b e 8a. Ao contrário, nas linhagens AS, a concentração de isopentenil adenina foi aumentada acima de 60% em comparação à WT, ou cerca de um aumento de quatro vezes sobre as linhagens OE (Figura 8f). Isto levou ao fenótipo oposto, a saber, ramificação profusa e ganho significativo de biomassa.

Os resultados do presente trabalho de Arabidopsis sugerem que a manipulação genética de HOG1 ou seus ortólogos em espécies de colheita pode fornecer meios para produção realçada. Avaliação quanto aos ortólogos de HOG1 em diversas outras espécies foi realizada. cDNAs foram bem-sucedidamente identificados e obtidos de arroz, *Brassica alboglabra*, crisântemo e amarantos. cDNA de tamanho natural de OsCBP (Proteína de Ligação de Citoquinina de *Oryza sativa*; Os11g0455500) foi isolado de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*, cultivar Nipponbare) por PCR de transcrição reversa. A sequência de aminoácido derivado de OsCBP (SEQ ID NO: 5) mostrou 90% de identidade de sequência a HOG1 (SEQ ID NO: 1) e parece existir apenas uma cópia do gene em arroz (Figura 10). Devido à similaridade de sequência elevada entre HOG1 (SEQ ID NO: 1) e OsCBP (SEQ ID NO: 5), linhagens de arroz transgênicas foram geradas usando cDNA de HOG1 a fim de testar se o traço de realce de produção pode ser obtido em arroz. Por transformação mediada por *Agrobacterium*, diversas linhagens de arroz independentes foram obtidas e confirmadas serem transgênicas por PCR de tempo real quantitativa e manchas do sul genômicas na geração T1 (Figuras 9, 12d e 12e). Os fenótipos nas linhagens OE e linhagens AS na geração T2 foram compativelmente segregantes com o transgene (linhagens de segregação não sobreviveram à seleção de higromicina). Germinação de sementes T3 no meio de seleção mostrou que diversas das linhagens selecionadas foram homozigotas com o transgene (dados não mostrados).

A análise de expressão de OsCBP foi realizada em linhagens OE e AS e na linhagem de origem híbrida (WT). Linhagens de superexpressão mostraram (Figura 9f) quase um aumento de 5 vezes nos níveis de expressão de HOG1 quando em comparação aos níveis de expressão de

OsCBP endógeno na WT. Adicionalmente, a expressão de OsCBP foi reduzida em seis vezes em algumas das linhagens OE (Figuras 9f), confirmando estas serem linhagens de cossupressão. O fenômeno de cossupressão de genes é bem-conhecido em plantas. Portanto, os fenótipos observados são devido à função do gene introduzido e não quaisquer efeitos não específicos de transformação. Os fenótipos das plantas transgênicas foram compatíveis com os resultados de Arabidopsis.

Nas linhagens OE, não existiu nenhuma mudança significativa no número de cultivos por planta quando em comparação à WT (Tabela 8), porém muitas das linhagens OE foram significativamente reduzidas em altura e ganho de peso total (Figura 9a, 9b, 9c e Tabela 8). As linhagens OE de arroz mostraram florescimento precoce quando em comparação à WT por 7-10 dias. Ao contrário, as linhagens AS mostraram uma redução de até 6 vezes nos níveis de expressão de OsCBP endógeno e exibiram um aumento significativo no número de cultivos por planta em comparação à linhagem de origem híbrida (Figuras 9b, 9c e 12b). A WT teve 7 a 9 cultivos, enquanto as linhagens AS mostraram entre 18 a 28 cultivos por planta (Tabela 8). Os fenótipos das linhagens de cossupressão foram iguais àqueles das linhagens AS (Figuras 9c, 9e, 12a, 12b e Tabela 8). Adicionalmente, as linhagens AS e de cossupressão mostraram ramificação dos nodos acima da terra dos cultivos principais (Figura 12d), levando a um aumento total significativo no número de panículas por planta (Tabela 8). O número médio de sementes e biomassa da planta aumentou em 2- a acima de 3 vezes nas linhagens AS e de cossupressão quando em comparação à WT (Tabela 8). Não existiu nenhuma outra mudança principal nos fenótipos das linhagens AS e de cossupressão em comparação às plantas WT. O aumento máximo em produção de grão por planta foi acima de duas vezes (variando de 1,5 a 2,7 vezes) maior do que da WT sob as condições de desenvolvimento em estufa. Geralmente, os dados de produção de condições de desenvolvimento em estufa para arroz foram menores do que aquele de condições de campo ideais. Portanto, é claro que se a estratégia descrita aqui for usada, ela poderá levar a um aumento significativo em produção sob condições de campo.

Tabela 7. Coeficiente de correlação de Pearson (r) dos parâmetros contribuindo para produção de semente e biomassa:

Coeficiente de correlação foi testado entre: Área da folha (cm²) x peso da semente (mg) por siliqua (A); Área da folha (cm²) x número de sementes por siliqua (B); e peso da semente por siliqua (mg) x número de sementes por siliqua (C). Após a análise de correlação, o teste t de Student foi realizado. Os valores do teste t são dados em colchetes. Os valores 'r' mostram correlação positiva em todos os testes. Com base nisto, pode ser predito que supressão antissense de HOG1 leva a um aumento nos parâmetros chave contribuindo para a produção de semente e biomassa da folha.

Genótipo da planta	A	B	C
Tipo selvagem	0,898 (t=2,043)	0,857 (t=2,755)	0,795 (t=3,84)
Linhagens antisentido de HOG1	0,763 (t=2,043)	0,847 (t=2,755)	0,912 (t=3,84)
Linhagens de super-expressão de HOG1	0,769 (t=2,078)	0,979 (t=2,878)	0,767 (t=2,269)

Tabela 8. Quantificação de parâmetros de produção nas plantas de arroz transgênicas de geração T2 abrigando cDNA de HOG1 de Arabidopsis de tamanho natural em orientação de sentido (superexpressão e cossupressão) ou antissense (conduzida por promotor de ubiquitina de arroz) levando à manipulação da expressão de gene de OsCBP endógeno.

As plantas foram agrupadas como 'Alta', 'Média' e 'Baixa' dentro de cada linhagem transgênica com base no número de cultivos por planta. O número total de cultivos, panículas e sementes por planta é apresentado como média $\pm$ SD. Apenas os grãos totalmente formados em cada planta foram contados. Os valores de área da folha representam a área de uma única folha. A segunda folha totalmente expandida do segundo cultivo de cada planta foi medida como um parâmetro indicativo. Determinação do peso fresco foi para a planta totalmente superenraizada e apenas as plantas selecionadas foram medidas para as diferentes linhagens.

Genótipo	Culti- vos/planta	Panícu- las/planta	Área da folha (cm ²)	Peso Fres- co/planta (g)	Semen- tes/planta
Tipo Selvagem (<i>Oryza sativa ssp. japonica</i> cv Nipponbare)					
Planta Nº 1	7	8	28	25	139
Planta Nº 3	9	9			143
Planta Nº 4	9	9			139
Media ± Des- vio padrão	8,3±1,0	8,6±0,5	-	-	140±2
Linhagens antissense					
Linha Nº 1S-2					
Alto					
Planta Nº 3	19	21	32	85	278
Planta Nº 12	26	24			151
Planta Nº 15	20	31			155
Media ± Des- vio padrão	21,6±4,0	25,0±5,0	-	-	194±72
Médio					
Planta Nº 1	18	36			378
Planta Nº 5	14	28			253
Planta Nº 9	15	31			155
Media ± Des- vio padrão	15,6±2,0	31,6±4,0	nd	nd	262±112
Baixo					
Planta Nº 6	11	29			191
Planta Nº 8	11	22			251
Planta Nº 10	9	16			127
Media ± Des- vio padrão	10,3±1,0	22,3±6,5	nd	nd	189,6±62
Linha Nº 1S-3					
Alto					
Planta Nº 1	21	32	35	89	158
Planta Nº 12	23	37	35	89	200
Planta Nº 13	28	40			203
Media ± Des- vio padrão	24±3,6	36,3±4,0	-	-	187±25
Médio					
Planta Nº 9	17	28			156

Genótipo	Culti- vos/planta	Panícu- las/planta	Área da folha (cm ²)	Peso Fres- co/planta (g)	Semen- tes/planta
Planta Nº 10	18	25			178
Planta Nº 15	18	23			258
Media ± Des- vio padrão	17,6±0,5	25,3±2,5	nd	nd	197±54
Baixo					
Planta Nº 2	14	20			209
Planta Nº 3	15	20			114
Planta Nº 14	14	25			56
Media ± Des- vio padrão	14,3±0,5	21,6±3,0	nd	nd	126±77
Linhagens de superexpressão					
Linha Nº 6-3					
Planta Nº 5	19	25			0
Planta Nº 6	13	9	7	20	0
Planta Nº 10	18	21			0
Media ± Des- vio padrão	16,6±3,2	18,3±8,3	-	-	0
Linha Nº 3T1					
Planta Nº 1	14	15			22
Planta Nº 2	16	24			32
Planta Nº 3	16	19			32
Media ± Des- vio padrão	15,3±1,0	19,3±4,5	nd	nd	18±16
Linhagens de cossupressão					
Linha Nº 1-3					
Alto					
Planta Nº 2	19	27	40	90	370
Médio					
Planta Nº 1	15	23			256
Planta Nº 4	14	32			184
Planta Nº 5	14	26			190
Media ± Des- vio padrão	14,3±0,5	27±4,5	nd	nd	210±40
Alto					
Planta Nº 8	10	17			281
Planta Nº 6	12	25			171

Genótipo	Cultivos/planta	Panículas/planta	Área da folha (cm ²)	Peso Fresco/planta (g)	Sementes/planta
Planta Nº 3	18	29			64
Media ± Desvio padrão	15±4,2	23,6±6,0	nd	nd	172±109
Linha Nº 4T-3					
Alto					
Planta Nº 1	15	22			153
Planta Nº 4	18	25	39	89	147
Media ± Desvio padrão	16,5±2,0	23,5±2,0	-	-	150±4
Médio					
Planta Nº 5	17	23			113
Planta Nº 3	13	20			130
Media ± Desvio padrão	15,0±3,0	21,5±2,0	nd	nd	122±12
Alto					
Planta Nº 2	12	23	nd	nd	131

Os presentes resultados de Arabidopsis e arroz sugerem que ortólogos de HOG1 podem ser usados para melhora de uma variedade de plantas de colheita. O número de cultivos por planta é um fator essencial que determina a produção nas maiores colheitas de cereal. Portanto, usando este método, existe um potencial para aumentar a produção de colheitas de cereal maiores como arroz, trigo, milho e cevada.

O aumento em biomassa é também um aspecto altamente desejável para plantas usadas para produção de etanol celulósico e vegetais folhosos bem como colheitas de forragem. Adicionalmente, superexpressão HOG1 ou estes ortólogos em espécies ornamentais podem ajudar a induzir o nanismo e florescimento precoce.

Aplicações

Os presentes inventores identificaram um método que tem o potencial de modular características em plantas, usando o polinucleotídeo isolado de SEQ ID NO: 2. Os métodos descritos aqui são capazes de realçar a produtividade agrícola e produção de grão por área unitária sob cultivo. Os métodos descritos aqui são úteis para realçar a produção de biomassa em

grama de forragem, e aumentar a ramificação em vegetais folhosos e folhagem de plantas. Os polinucleotídeos isolados descritos aqui podem ser administrados a plantas tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas para produzir plantas com características moduladas úteis para melhora de colheita e outros usos comerciais e científicos.

Em particular, produção de biomassa é uma indústria em desenvolvimento quando o interesse em fontes de combustível sustentáveis está em desenvolvimento. Sem ser ligado pela teoria, é especulado que a abundância de biomassa produzida pelos métodos descritos aqui pode ser convertida em biocombustível, tais como combustível de gás metílico, biometanol ou bioetanol. Por exemplo, álcool pode ser produzido de material celulósico por métodos de hidrólise conhecida, fermentação e destilação. Portanto, o uso de combustível de biomassa é visto como uma fonte de energia renovável considerada por alguns como um método de reduzir emissões de gás de estufa e fornecer uma alternativa aos combustíveis de fóssil.

Será evidente que várias outras modificações e adaptações da invenção serão evidentes para a pessoa versada na técnica após leitura da descrição anterior sem afastar-se do espírito e escopo da invenção e pretende-se que todas as modificações e adaptações incluam-se no escopo das reivindicações anexas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Kumar P, National University of Singapore
 <120> Receptor de Citocinina Putativa e Métodos para Uso do Mesmo
 <130> 10104SG744
 5 <140> US 60/888,136
 <141> 2007-02-05
 <160> 30
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 10 <211> 485
 <212> PRT
 <213> HOG1 Arabidopsis thaliana
 <400> 1

 Met Ala Leu Ile Val Glu Lys Thr Ser Gly Gly Arg Glu Tyr Lys Val
 15 1 5 10 15
 Lys Asp Met Ser Gln Ala Asp Phe Gly Arg Leu Glu Leu Glu Leu Ala
 20 25 30
 Glu Val Glu Met Pro Gly Leu Met Ala Cys Arg Thr Glu Phe Gly Pro
 35 40 45
 Ala Gln Pro Phe Lys Gly Ala Arg Ile Thr Gly Ser Leu His Met Thr
 20 50 55 60
 Ile Gln Thr Ala Val Leu Ile Glu Thr Leu Thr Ala Leu Gly Ala Glu
 65 70 75 80
 Val Arg Trp Cys Ser Cys Asn Ile Phe Ser Thr Gln Asp His Ala Ala
 25 85 90 95
 Ala Ala Ile Ala Arg Asp Ser Ala Ala Val Phe Ala Trp Lys Gly Glu
 100 105 110
 Thr Leu Gln Glu Tyr Trp Trp Cys Thr Glu Arg Ala Leu Asp Trp Gly
 115 120 125
 30 Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Ile Val Asp Asp Gly Gly Asp Ala Thr
 130 135 140
 Leu Leu Ile His Glu Gly Val Lys Ala Glu Glu Ile Phe Glu Lys Thr

145 150 155 160
 Gly Gln Val Pro Asp Pro Thr Ser Thr Asp Asn Pro Glu Phe Gln Ile
 165 170 175
 Val Leu Ser Ile Ile Lys Glu Gly Leu Gln Val Asp Pro Lys Lys Tyr
 5 180 185 190
 His Lys Met Lys Gly Arg Leu Val Gly Val Ser Glu Glu Thr Thr Thr
 195 200 205
 Gly Val Lys Arg Leu Tyr Gln Met Gln Glu Ser Gly Ala Leu Leu Phe
 210 215 220
 10 Pro Ala Ile Asn Val Asn Asp Ser Val Thr Lys Ser Lys Phe Asp Asn
 225 230 235 240
 Leu Tyr Gly Cys Arg His Ser Leu Pro Asp Gly Leu Met Arg Ala Thr
 245 250 255
 Asp Val Met Ile Ala Gly Lys Val Ala Val Ile Cys Gly Tyr Gly Asp
 15 260 265 270
 Val Gly Lys Gly Cys Ala Ala Ala Met Lys Thr Ala Gly Ala Arg Val
 275 280 285
 Ile Val Thr Glu Ile Asp Pro Ile Cys Ala Leu Gln Ala Met Met Glu
 290 295 300
 20 Gly Leu Gln Val Leu Thr Leu Glu Asp Val Val Ser Glu Ala Asp Ile
 305 310 315 320
 Phe Val Thr Thr Thr Gly Asn Lys Asp Ile Ile Met Val Asp His Met
 325 330 335
 Arg Lys Met Lys Asn Asn Ala Ile Val Cys Asn Ile Gly His Phe Asp
 25 340 345 350
 Asn Glu Ile Asp Met Gln Gly Leu Glu Thr Phe Pro Gly Val Lys Arg
 355 360 365
 Ile Thr Ile Lys Pro Gln Thr Asp Arg Trp Val Phe Pro Asp Thr Lys
 370 375 380
 30 Ser Gly Ile Ile Val Leu Ala Glu Gly Arg Leu Met Asn Leu Gly Cys
 385 390 395 400
 Ala Thr Gly His Pro Ser Phe Val Met Ser Cys Ser Phe Thr Asn Gln

	405	410	415
	Val Ile Ala Gln Leu Glu Leu Trp Asn Glu Lys Ser Ser Gly Lys Tyr		
	420	425	430
	Glu Lys Lys Val Tyr Val Leu Pro Lys His Leu Asp Glu Lys Val Ala		
5	435	440	445
	Ala Leu His Leu Gly Lys Leu Gly Ala Lys Leu Thr Lys Leu Thr Lys		
	450	455	460
	Asp Gln Ser Asp Tyr Val Ser Ile Pro Ile Glu Gly Pro Tyr Lys Pro		
	465	470	475
10	Pro His Tyr Arg Tyr		480
	485		
	<210>	2	
	<211>	1775	
	<212>	DNA	
15	<213>	CDNA de HOG1 Arabidopsis thaliana	
	<400>	2	
	ggccgcggga attcgatttc tccccccct gccccaatct tagatccgaa aaaatggcgt	60	
	tgatcggtga gaagacgtcg ggtggccgtg agtacaaggt caaggacatg tctcaggccg	120	
	acttcggtcg tctcgagctc gagctcgccg aagttgagat gccaggactc atggcttgcc	180	
20	gtaccgagtt cggcccagct cagcccttca aaggcgctag aatcaccgga tctctccaca	240	
	tgacgatcca gaccgccgtc ctcatcgaaa ccctaaccgc cctcgggcgcg gaagtcagat	300	
	ggtgctcctg caacatcttc tcaacccaag accacgccgc cgccgcaatc gcccgtagct	360	
	ccgccgcggt tttcgcttgg aaaggtgaga cgcttcagga gtactgggtg tgacaggagc	420	
	gtgctctcga ctggggccca ggtggtggtc cagatctgat cgtcgatgac ggtggcgacg	480	
25	ccacgctttt gatccacgag ggagtgaagg ccgaggagat ctttgagaag acgggtcagg	540	
	ttcctgatcc cacttccact gacaaccctg agttccagat cgtgctttcg atcatcaagg	600	
	aaggtctcca ggttgatcct aagaagtacc acaagatgaa ggggagactc gtcggtgtct	660	
	ctgaggagac caccaccggt gtcaagaggc tttaccagat gcaggaaagt ggagcccttt	720	
	tgttcccagc cattaacgtc aacgactccg tcaccaagag caagttcgac aacttgtagc	780	
30	gttgccgtca ctctctacct gatggtctca tgaggggccac tgatgtcatg atcgccggaa	840	
	aggttgcggt tatctgtggt tatggtgatg tcggtaaggg ttgtgccgct gccatgaaaa	900	
	ccgctggtgc tagagtcatt gtgaccgaga tcgaccccat ctgtgcccta caagctatga	960	

	tggaagggct tcaagttctg acccttgagg atgtcgtctc tgaagctgac atctttgtca	1020
	ccaccaccgg taacaaagac atcatcatgg ttgaccacat gaggaagatg aagaacaacg	1080
	ctatcgtctg caacattggg cactttgaca acgagattga catgcaagga cttgagacct	1140
	tccctggagt gaagcgtatc accatcaagc cccagaccga caggtgggtg ttcccagaca	1200
5	ccaagtccgg aatcattgtt ttggccgagg gtcgtctcat gaacttgggt tgtgccactg	1260
	gtcacccaag tttcgtgatg tcttgctctt tcaccaacca ggtgattgcc cagcttgagc	1320
	tttggaacga gaagtcgagc ggtaagtacg agaagaaggt gtacgttcta cccaagcatt	1380
	tggatgagaa ggttgcgga cttcacttgg gcaagcttgg agctaagctc actaagctga	1440
	caaaggacca atctgactac gtcagcatto caattgaggg accatacaag cctcctcact	1500
10	acaggtactg agagagagag agagtcgaca aagcggttca ggttcggatc tacttgtggg	1560
	tttgtgttgg gttgtgttgg gagagtggaa cagtttgaga tatttgtctt ctgatgaagt	1620
	tgaccaaata tcagtattaa taagggttat tggcttttga aggttgtgct tggtttctcc	1680
	atttttcatg aaacttaaat tagtttttgg tttagtttcc ctcttgattt tattttgtgt	1740
	gttctgttta gcgttgact cttcaaacaa atgag	1775
15	<210> 3	
	<211> 485	
	<212> PRT	
	<213> Nicotiana tabacum, homólogo de cv. Xanthi (sequência de aminoácido)	
20	<400> 3	
	Met Ala Leu Leu Val Glu Lys Thr Thr Ser Gly Arg Glu Tyr Lys Val	
	1 5 10 15	
	Lys Asp Met Ser Gln Ala Asp Phe Gly Arg Leu Glu Ile Glu Leu Ala	
	20 25 30	
25	Glu Val Glu Met Pro Gly Leu Met Ala Cys Arg Thr Glu Phe Gly Pro	
	35 40 45	
	Ser Gln Pro Phe Lys Gly Ala Lys Ile Thr Gly Ser Leu His Met Thr	
	50 55 60	
	Ile Gln Thr Ala Val Leu Ile Glu Thr Leu Thr Ala Leu Gly Ala Glu	
30	65 70 75 80	
	Val Arg Trp Cys Ser Cys Asn Ile Phe Ser Thr Gln Asp His Ala Ala	
	85 90 95	

Ala Ala Ile Ala Arg Asp Ser Ala Ala Val Phe Ala Trp Lys Gly Glu
 100 105 110
 Thr Leu Gln Glu Tyr Trp Trp Cys Thr Glu Arg Ala Leu Asp Trp Gly
 115 120 125
 5 Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Ile Val Asp Asp Gly Gly Asp Ala Thr
 130 135 140
 Leu Leu Ile His Glu Gly Val Lys Ala Glu Glu Glu Phe Ala Lys Asn
 145 150 155 160
 Gly Thr Ile Pro Asp Pro Asn Ser Thr Asp Asn Ala Glu Phe Gln Leu
 10 165 170 175
 Val Leu Thr Ile Ile Lys Glu Ser Leu Lys Thr Asp Pro Leu Lys Tyr
 180 185 190
 Thr Lys Met Lys Glu Arg Leu Val Gly Val Ser Glu Glu Thr Thr Thr
 195 200 205
 15 Gly Val Lys Arg Leu Tyr Gln Met Gln Ala Asn Gly Thr Leu Leu Phe
 210 215 220
 Pro Ala Ile Asn Val Asn Asp Ser Val Thr Lys Ser Lys Phe Asp Asn
 225 230 235 240
 Leu Tyr Gly Cys Arg His Ser Leu Pro Asp Gly Leu Met Arg Ala Thr
 20 245 250 255
 Asp Val Met Ile Ala Gly Lys Val Ala Leu Val Ala Gly Tyr Gly Asp
 260 265 270
 Val Gly Lys Gly Cys Ala Ala Ala Leu Lys Gln Ala Gly Ala Arg Val
 275 280 285
 25 Ile Val Thr Glu Ile Asp Pro Ile Cys Ala Leu Gln Ala Thr Met Glu
 290 295 300
 Gly Leu Gln Val Leu Thr Leu Glu Asp Val Val Ser Asp Val Asp Ile
 305 310 315 320
 Phe Val Thr Thr Thr Gly Asn Lys Asp Ile Ile Met Val Asp His Met
 30 325 330 335
 Arg Lys Met Lys Asn Asn Ala Ile Val Cys Asn Ile Gly His Phe Asp
 340 345 350

	Asn Glu Ile Asp Met Leu Gly Leu Glu Thr Tyr Pro Gly Val Lys Arg	
	355 360 365	
	Ile Thr Ile Lys Pro Gln Thr Asp Arg Trp Val Phe Pro Asp Thr Asn	
	370 375 380	
5	Ser Gly Ile Ile Val Leu Ala Glu Gly Arg Leu Met Asn Leu Gly Cys	
	385 390 395 400	
	Ala Thr Gly His Pro Ser Phe Val Met Ser Cys Ser Phe Thr Asn Gln	
	405 410 415	
	Val Ile Ala Gln Leu Glu Leu Trp Asn Glu Lys Ser Ser Gly Lys Tyr	
10	420 425 430	
	Glu Lys Lys Val Tyr Val Leu Pro Lys His Leu Asp Glu Lys Val Ala	
	435 440 445	
	Ala Leu His Leu Gly Lys Leu Gly Ala Lys Leu Thr Lys Leu Ser Lys	
	450 455 460	
15	Asp Gln Ala Asp Tyr Ile Ser Val Pro Val Glu Gly Pro Tyr Lys Pro	
	465 470 475 480	
	Ala His Tyr Arg Tyr	
	485	
	<210> 4	
20	<211> 1812	
	<212> DNA	
	<213> Nicotiana tabacum, homólogo de cv. Xanthi (sequência de nucleo- tídeo)	
	<400> 4	
25	gaagagaaaa aagcctctca aatctcatct ctāaccaccc aatttctcat actcgctcta	60
	cccatggctc tattagtcga gaagaccacc tctggccgcg agtacaaggc caaggacatg	120
	tctcaggccg atttcggccg gcttgaaatc gagctggccg aagttgaaat gcctgggtctc	180
	atggcttgct gtactgaatt tggcccttca cagccattta aaggtgctaa gattactgga	240
	tctttacata tgaccattca aactgcagtt ttgattgaaa cccttactgc tttgggtgct	300
30	gaagtttagat ggtgttcttg caacatcttc tccactcaag atcacgccgc tgctgccatt	360
	gcacgtgaca gcgccgccgt gttcgcgtgg aagggtgaga ctctgcagga gtattggtgg	420
	tgtactgaga gggcacttga ctgggggtcca ggtgggtgggc ccgacttgat cgtcgacgat	480

	gggtggtgatg ctacactctt gattcatgag ggtggttaagg cagaagaaga gtttgctaag	540
	aatgggacaa tcccagatcc taactctacc gataatgctg agtttcagct tgtacttact	600
	attattaagg aaagtttgaa gactgatcct ttaaaatata ccaagatgaa ggaaagactc	660
	gtcgggtgttt ctgaggaaac taccactgga gttaagaggc tttatcagat gcaggctaata	720
5	ggaactttgc ttttcctgc tattaatggt aatgattctg ttaccaagag caagttcgac	780
	aacttgtacg gatgccgcca ctactgccc gatggctca tgagggctac tgatgttatg	840
	attgccggaa aggttgccct tgttgctggt tatggagatg tcggcaaggg ttgtgctgct	900
	gccttgaaac aagccggtgc ccgtgtgatt gtgaccgaga ttgaccctat ctgtgctctc	960
	caggctacca tggaaggcct ccaggctcct actctagagg atgtcgtttc tgatgttgat	1020
10	atctttgtca ccacgaccgg taacaaggac attatcatgg ttgaccacat gaggaagatg	1080
	aagaacaatg ccattgtttg caacattggt cactttgaca acgaaatcga catgcttggt	1140
	ctcgagacct accctggtgt caagaggatc acaattaagc ctcaaaccga cagatgggtc	1200
	ttccctgaca ccaacagtgg catcattgtc ttggctgagg gtcgtctcat gaacttggga	1260
	tgtgccacag gacaccctag ttttgtgatg tcgtgctcgt tcactaacca agtcattgcc	1320
15	caactcgagt tgtggaatga aaagagcagt gggaaagtatg agaagaaagt gtatgtcttg	1380
	ccaaaacacc tcgacgagaa ggttgctgca cttcatctcg gaaagctcgg agccaagctt	1440
	accaaacttt cgaaggatca agctgactac attagcgttc cagttgaggg tccttacaag	1500
	cctgctcact acaggtactg agcgaaaaca aatcgacaga ggagaacagc attgtcgcgg	1560
	catgattggt ttgcatttaa tactttgatt ttgtttagga tactagtatt ttgaatattg	1620
20	gtggtgatat atttgggagg aagtggcatg ttttgctgga aaagaaatgg gtcttatttg	1680
	aaagtaagac caaaatgtgt tgaataagat tatggttggt ggtgtgatat gatattgtag	1740
	taagttagaa ccatttgctt tttggtgtat ggtttttggt tcaagaaatc aaagcaacac	1800
	ttttaccttt tc	1812
	<210> 5	
25	<211> 485	
	<212> PRT	
	<213> Homólogo de Oryza sativa (sequência de aminoácido), OsCBP	
	<400> 5	
	Met Ala Leu Ser Val Glu Lys Thr Ser Ser Gly Arg Glu Tyr Lys Val	
30	1 5 10 15	
	Lys Asp Leu Ser Gln Ala Asp Phe Gly Arg Leu Glu Ile Glu Leu Ala	
	20 25 30	

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

Ile Val Thr Glu Ile Asp Pro Ile Cys Ala Leu Gln Ala Leu Met Glu
 290 295 300
 Gly Leu Gln Val Leu Thr Leu Glu Asp Val Val Ser Glu Ala Asp Ile
 305 310 315 320
5 Phe Val Thr Thr Thr Gly Asn Lys Asp Ile Ile Met Val Asp His Met
 325 330 335
 Arg Lys Met Lys Asn Asn Ala Ile Val Cys Asn Ile Gly His Phe Asp
 340 345 350
 Asn Glu Ile Asp Met Leu Gly Leu Glu Thr Tyr Pro Gly Val Lys Arg
10 355 360 365
 Ile Thr Ile Lys Pro Gln Thr Asp Arg Trp Val Phe Pro Glu Thr Asn
 370 375 380
 Thr Gly Ile Ile Val Leu Ala Glu Gly Arg Leu Met Asn Leu Gly Cys
 385 390 395 400
15 Ala Thr Gly His Pro Ser Phe Val Met Ser Cys Ser Phe Thr Asn Gln
 405 410 415
 Val Ile Ala Gln Leu Glu Leu Trp Lys Glu Lys Ser Thr Gly Lys Tyr
 420 425 430
 Glu Lys Lys Val Tyr Val Leu Pro Lys His Leu Asp Glu Lys Val Ala
20 435 440 445
 Ala Leu His Leu Gly Lys Leu Gly Ala Arg Leu Thr Lys Leu Ser Lys
 450 455 460
 Ser Gln Ala Asp Tyr Ile Ser Val Pro Val Glu Gly Pro Tyr Lys Pro
 465 470 475 480
25 Ala His Tyr Arg Tyr
 485
 <210> 6
 <211> 1458
 <212> DNA
30 <213> Oryza sativa homolog (nucleotide sequence), OsCPB
 <400> 6
 atggcgctct ccgtggagaa gacctcgctcg gggagggagt acaaggtgaa ggacctctcc

	caggcggact tcggccgcct cgagatcgag ctgcccagg tcgagatgcc ggggctcatg	120
	gcgtgccgcg ccgagttcgg cccctcccag ccgttcaagg gcgcccggat ctccgggtcc	180
	ctccacatga ccatccagac cgccgtcctc atcgagaccc tcaccgccct tggcgccgag	240
	gtccgctggt gctcctgcaa catcttctcc acgcaggacc acgcgcgcgc cgccatcgcc	300
5	agggactccg ccgccgtggt cgccctggaag ggggagaccc tcgaggagta ctggtggtgc	360
	accgagcgct gcctcgactg gggcgtcggc ggcgggcccg acctcatcgt cgacgacggc	420
	ggcgacgcca cgctgctcat ccacgagggc gtcaaggccg aggaggagtt cgagaagtca	480
	ggcaagggtcc ccgaccgga gtccaccgac aacgccgagt tcaagatcgt gtcaccatc	540
	atccgcgacg gcctcaagtc cgaccccagc aagtaccgca agatgaagga gaggctcgtc	600
10	ggagtctccg aggagaccac caccggtgtc aagaggctct accagatgca ggagaccggc	660
	gccctcctct tccccgcat caacgtcaac gactccgtca ccaagagcaa gtttgacaac	720
	ctgtatggtt gccgccactc tctccctgat ggtctcatga gggctaccga tgttatgatc	780
	gctggcaagg ttgccgtggt ctgcggttat ggtgatgttg gcaagggtg tgctgctgct	840
	ctcaagcagg ctggtgcccg tgtcattggt actgagattg accccatctg tgccctccag	900
15	gcccttatgg agggctctcca ggtcctcacc ttggaggatg ttgtctcgga ggctgacatc	960
	tttgtgacca ccaactggcaa caaggacatc ataatggttg accacatgag gaagatgaag	1020
	aacaatgcca tcgtttgcaa cattgggtcac ttgacaatg agattgacat gtcggcctt	1080
	gagacctacc ctggtgtcaa gcgcatacc atcaagcctc agaccgaccg ctgggtcttc	1140
	cctgagacca acaactggcat cattgtcctt gctgagggtc gtctcatgaa ccttgggtgc	1200
20	gctactggcc accccagttt tgtcatgtcc tgctcattca ctaaccaggt cattgtcag	1260
	cttgagctgt ggaaggagaa gagcactggc aagtacgaga agaagggtgta cgttcttccc	1320
	aagcacctcg acgagaagggt ggccgcctc cacttgggca agcttgggtgc caggctgacc	1380
	aagctctcca agtcgcaggc tgactacatc agcgttccag ttgagggtcc ctacaagccc	1440
	gcgcactacc ggtactag	1458
25	<210> 7	
	<211> 485	
	<212> PRT	
	<213> Homólogo de Triticum aestivum (sequência de aminoácido)	
	<400> 7	
30	Met Ala Leu Ser Val Glu Lys Thr Ser Ser Gly Arg Glu Tyr Lys Val	
	1 5 10 15	
	Lys Asp Leu Phe Gln Ala Asp Phe Gly Arg Leu Glu Leu Glu Leu Ala	

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

	275	280	285
	Ile Val Thr Glu Ile Asp Pro Ile Cys Ala Leu Gln Ala Leu Met Glu		
	290	295	300
	Gly Ile Gln Ile Leu Thr Leu Glu Asp Val Val Ser Glu Ala Asp Ile		
5	305	310	315 320
	Phe Val Thr Thr Thr Gly Asn Lys Asp Ile Ile Met Val Asp His Met		
	325	330	335
	Arg Lys Met Lys Asn Asn Ala Ile Val Cys Asn Ile Gly His Phe Asp		
	340	345	350
10	Asn Glu Ile Asp Met Asn Gly Leu Glu Thr Tyr Pro Gly Val Lys Arg		
	355	360	365
	Ile Thr Ile Lys Pro Gln Thr Asp Arg Trp Val Phe Pro Glu Thr Lys		
	370	375	380
	Thr Gly Ile Ile Val Leu Ala Glu Gly Arg Leu Met Asn Leu Gly Cys		
15	385	390	395 400
	Ala Thr Gly His Pro Ser Phe Val Met Ser Cys Ser Phe Thr Asn Gln		
	405	410	415
	Val Ile Ala Gln Leu Glu Leu Trp Asn Glu Lys Ala Ser Gly Lys Tyr		
	420	425	430
20	Glu Lys Lys Val Tyr Val Leu Pro Lys His Leu Asp Glu Lys Val Ala		
	435	440	445
	Ala Leu His Leu Gly Lys Leu Gly Ala Arg Leu Thr Lys Leu Thr Lys		
	450	455	460
	Ser Gln Ser Asp Tyr Ile Ser Ile Pro Ile Glu Gly Pro Tyr Lys Leu		
25	465	470	475 480
	Arg Leu Tyr Arg Tyr		
	485		
	<210>	8	
	<211>	1708	
30	<212>	DNA	
	<213>	Homólogo Triticum aestivum (sequência de nucleotídeo)	
	<400>	8	

	aatccaccaa ccttctccat ggcgctctcc gtggagaaga cctcgtcggg ccgggagtac	60
	aaggtcaagg acctcttcca ggccgacttc ggccgcctcg agctcgagct cgccgaggtc	120
	gagatgcccg gcctcatggc ctgccgcacc gagttcggcc cctcgcagcc cttcaagggc	180
	gcccggatct ccggctccct ccacatgacc atccagaccg ccgtcctcat cgagaccctc	240
5	accgccctcg gcgccgaggt ccgctgggtgc tcctgcaaca tcttctccag ccaggaccac	300
	gccgccgccg ccatcgcccg cgactccgcg gccgtcttcg cctggaaggg cgagaccctc	360
	gaggagtact ggtgggtgcac cgagcgctgc ctcgactggg gcgtcggcgg cggccccgac	420
	ctcatcgtcg acgacggcgg tgacgccacg ctgctcatcc acgagggcgt caaggccgag	480
	gaggagttcg agaaatccgg caaggttccc gacccgaggt ccaccgaaa ccccgagttc	540
10	aagatcgctc tcaccatcat ccgcgacggg ctcaagaccg acgccagcaa gtaccgcaag	600
	atgaaggaga ggctcgtcgg tgtctccgag gagaccacca ccggcgtcaa gaggtcttac	660
	cagatgcagg agtccggcac cctcctcttc cccgccatca acgtcaacga ctccgtcacc	720
	aagagcaagt ttgacaacct ttacggttgc cgtcactcgc tccctgatgg tcttatgagg	780
	gccactgatg ttatgatcgc cggcaaggtc gccgtggtct gcggttacgg tgatgttggc	840
15	aagggtgtg ccgccgcact caagcaggct ggtgcccggtg tgatcgtgac agagattgac	900
	cccatctgtg cccttcaggc cctgatggag ggtatccaga tcctcacctt ggaggatggt	960
	gtctctgagg ctgacatctt tgtgaccacc accggaaaca aggacatcat catggtcgac	1020
	cacatgagga agatgaagaa caacgccatt gtctgcaaca ttgggtcactt tgacaatgag	1080
	atcgacatga acggccttga gacctacctt ggtgtcaagc gcatcaccat caagccccag	1140
20	actgaccgtt gggctctccc cgagaccaag actggcatca ttgttcttgc tgagggtcgt	1200
	ctgatgaacc ttggatgtgc cactggccac ccagccttg tcatgtcctg ctcatcacc	1260
	aaccaggtta ttgctcagct tgagttgtgg aacgagaagg ccagtggcaa gtatgagaag	1320
	aagggtgacg ttctcccaa gcacctcgac gagaaggctg cggccctcca cttgggcaag	1380
	ctcggcgcca ggctgacaa gctcaccaag tccagtcctg actacattag catcccaatt	1440
25	gagggctcctt acaagctcgc gctttaccgg tactagtgtg tccagcatga ctacggcgtg	1500
	gcctgagcct gagtcggagc agcggcacca acgggaactc tatcaactat cctgtttccc	1560
	ttctattatc ttacatgctg tctcttaggc ggaggatttg ttattatggt tatgttttga	1620
	gccttgtgag ggttgggaga ggccgcttt gcttttgccc agaaataatg gcattattat	1680
	tggtttaagt gaggaggtgt gcttttcc	1708
30	<210> 9	
	<211> 485	
	<212> PRT	

<213> Homólogo de Crisântemo (sequência de aminoácido)

<400> 9

Met Ser Leu Thr Val Glu Lys Thr Thr Ser Gly Arg Glu Tyr Lys Val
 1 5 10 15

5 Lys Asp Met Ser Leu Ala Asp Phe Gly Arg Leu Glu Leu Glu Leu Ala
 20 25 30

Glu Val Glu Met Pro Gly Leu Met Ser Cys Arg Thr Glu Phe Gly Pro
 35 40 45

Ser Gln Pro Phe Lys Gly Ala Arg Ile Thr Gly Ser Leu His Met Thr
 10 50 55 60

Ile Gln Thr Gly Val Leu Ile Glu Thr Leu Thr Ala Leu Gly Ala Glu
 65 70 75 80

Val Arg Trp Cys Ser Cys Asn Ile Phe Ser Thr Gln Asp His Ala Ala
 85 90 95

15 Ala Ala Ile Ala Arg Asp Ser Ala Ala Val Phe Ala Trp Lys Gly Glu
 100 105 110

Thr Leu Gln Glu Tyr Trp Trp Cys Thr Glu Arg Ala Leu Asp Trp Gly
 115 120 125

Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Ile Val Asp Asp Gly Gly Asp Ala Thr
 20 130 135 140

Leu Leu Ile His Glu Gly Val Lys Ala Glu Glu Glu Phe Ala Lys Ser
 145 150 155 160

Gly Lys Leu Pro Asp Pro Thr Ser Thr Asp Asn Ala Glu Phe Gln Ile
 165 170 175

25 Val Leu Ser Ile Ile Lys Glu Gly Leu Ser Thr Asp Pro Leu Lys Tyr
 180 185 190

His Lys Met Lys Glu Arg Leu Val Gly Val Ser Glu Glu Thr Thr Thr
 195 200 205

Gly Val Lys Arg Leu Tyr Gln Met Gln Ala Asn Gly Thr Leu Leu Phe
 30 210 215 220

Pro Ala Ile Asn Val Asn Asp Ser Val Thr Lys Ser Lys Phe Asp Asn
 225 230 235 240

Leu Tyr Gly Cys Arg His Ser Leu Pro Asp Gly Leu Met Arg Ala Thr
 245 250 255
 Asp Val Met Ile Ala Gly Lys Val Ala Val Val Cys Gly Tyr Gly Asp
 260 265 270
5 Val Gly Lys Gly Cys Ala Ser Ala Met Lys Gln Ala Gly Ala Arg Val
 275 280 285
 Ile Val Thr Glu Ile Asp Pro Ile Cys Ala Leu Gln Ala Thr Met Glu
 290 295 300
 Gly Leu Gln Val Leu Thr Leu Glu Asp Val Val Ser Glu Ala Asp Ile
10 305 310 315 320
 Phe Val Thr Thr Thr Gly Asn Lys Asp Ile Ile Met Val Asp Asp Met
 325 330 335
 Arg Lys Met Lys Asn Asn Ala Ile Val Cys Asn Ile Gly His Phe Asp
 340 345 350
15 Asn Glu Ile Asp Met Leu Gly Leu Glu Thr Tyr Pro Gly Val Lys Arg
 355 360 365
 Ile Thr Ile Lys Pro Gln Thr Asp Arg Trp Val Phe Pro Glu Thr Lys
 370 375 380
 Ser Gly Val Ile Ile Leu Ala Glu Gly Arg Leu Met Asn Leu Gly Cys
20 385 390 395 400
 Ala Thr Gly His Pro Ser Phe Val Met Ser Cys Ser Phe Thr Asn Gln
 405 410 415
 Val Ile Ala Gln Leu Glu Leu Trp Asn Glu Lys Gly Thr Gly Lys Tyr
 420 425 430
25 Lys Lys Glu Val Tyr Val Leu Pro Lys His Leu Asp Glu Lys Val Ala
 435 440 445
 Ala Leu His Leu Gly Lys Leu Gly Ala Lys Leu Thr Lys Leu Thr Lys
 450 455 460
 Asp Gln Ser Asp Tyr Leu Ser Ile Pro Ile Glu Gly Pro Tyr Lys Pro
30 465 470 475 480
 Ala Ala Tyr Arg Tyr
 485

	<210>	10	
	<211>	1535	
	<212>	DNA	
	<213>	Homólogo de crisântemo (sequência de nucleotídeo)	
5	<400>	10	
	gatcagatct	caaaacccaa accttaaacc atgtctctta ctgtagagaa aaccacctct	60
	ggccgtgaat	acaaggtcaa ggacatgtcc ttggctgact tcggccgtct cgaactcgag	120
	ttagccgagg	tcgagatgcc cgggcttatg tcctgcagga ccgaattcgg cccttctcag	180
	ccttttaagg	gagccagaat cactggatcc cttcacatga ccatccagac cgggtgttctt	240
10	attgaaactt	tgactgcttt ggggtgctgag gttagatggg gctcttgcaa catcttttcg	300
	acccaagacc	atgctgctgc agccattgct cgtgactctg ctgcggtttt cgcttggaag	360
	ggggagactc	ttcaggagta ctgggtgggt actgagcgag cacttgactg ggggtccaggt	420
	ggtggctcctg	atttgattgt ggatgatggg ggtgatgcta cgcttttgat ccatgaggga	480
	gtgaaggccg	aggaggagtt cgccaagagc ggtaaattgc ctgacccac ttccactgac	540
15	aatgctgagt	tccagattgt gttgtcgatt attaaggaag gactttcgac cgacccattg	600
	aagtaccaca	agatgaagga aagactagtt ggtgtctctg aggaaaccac cactgggtgtc	660
	aagaggttgt	accaaagca agccaacggt actttgttgt tccctgccat caatgttaac	720
	gattccgtca	ccaagagcaa gtttgacaac ttgtatggat gccgtcactc actccctgat	780
	ggtttgatga	gagctactga tgtcatgac gccgaaagg ttgcagtcgt ctgtgggttac	840
20	ggagatggtg	gaaagggttg tgcttcagcc atgaagcaag ctgggtgctg tgtcattgtg	900
	acagaaattg	atcccatctg tgctcttcag gctaccatgg aagggtctcca agtgctaact	960
	ttggaagatg	tcgtatccga agctgatatt tttgttacca ccaccggtaa caaggacatc	1020
	atcatgggtg	atgacatgag gaagatgaag aacaatgcca tcgtctgcaa cattgggtcac	1080
	tttgacaatg	aaatcgacat gcttgggtct gagacttacc ctgggtgtcaa gagaatcacc	1140
25	atcaagcccc	aaaccgacag gtgggtgttc cccgagacca agagtggcgt cattatcttg	1200
	gctgagggta	ggctcatgaa cttgggttgt gctactgggt accctagttt cgtgatgtct	1260
	tgctctttca	ctaaccaagt gattgctcaa cttgagttgt ggaatgagaa ggggaaccggc	1320
	aagtacaaga	aggaggtgta tgtgttgccc aagcaccttg acgagaaggt ggctgcactt	1380
	catcttgga	agcttgagc caagctcact aagctcacca aggaccagtc tgactacctc	1440
30	agcattccta	ttgaagggtcc ttacaagcct gctgcctaca ggtactgatc aaagaggata	1500
	tctgctgttc	agcaagactt tgaagaacct atggg	1535
	<210>	11	

<211> 466
 <212> PRT
 <213> Homólogo de Brassica alboglabra (sequência de aminoácido)
 <400> 11

5 Met Ala Leu Ile Val Glu Lys Thr Ser Ser Gly Arg Glu Tyr Lys Val

1 5 10 15

Lys Asp Met Ser Gln Ala Asp Phe Gly Arg Leu Glu Leu Glu Leu Ala

20 25 30

Glu Val Glu Met Pro Gly Leu Met Ala Cys Arg Thr Glu Phe Gly Pro

10 35 40 45

Ala Gln Pro Phe Lys Gly Ala Arg Ile Thr Gly Ser Leu His Met Thr

50 55 60

Ile Gln Thr Ala Val Leu Ile Glu Thr Leu Thr Ala Leu Gly Ala Glu

65 70 75 80

15 Val Arg Trp Cys Ser Cys Asn Ile Phe Ser Thr Gln Asp His Ala Ala

85 90 95

Ala Ala Ile Ala Arg Asp Ser Ala Ala Val Phe Ala Trp Lys Gly Glu

100 105 110

Thr Leu Gln Glu Tyr Trp Trp Cys Thr Glu Arg Ala Leu Asp Trp Gly

20 115 120 125

Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Ile Val Asp Asp Gly Gly Asp Ala Thr

130 135 140

Leu Leu Ile His Glu Gly Val Lys Ala Glu Glu Ile Phe Glu Lys Thr

145 150 155 160

25 Gly Gln Val Pro Asp Pro Thr Ser Thr Asp Asn Pro Glu Phe Gln Ile

165 170 175

Val Leu Ser Ile Ile Lys Glu Gly Leu Gln Val Asp Pro Lys Lys Tyr

180 185 190

His Lys Met Lys Glu Arg Leu Val Gly Val Ser Glu Glu Thr Thr Thr

30 195 200 205

Gly Val Lys Arg Leu Tyr Gln Met Gln Glu Ser Gly Ala Leu Leu Phe

210 215 220

Pro Ala Ile Asn Val Asn Asp Ser Val Thr Lys Ser Lys Phe Asp Asn
 225 230 235 240
 Leu Tyr Gly Cys Arg His Ser Leu Pro Asp Gly Leu Met Arg Ala Thr
 245 250 255
5 Asp Val Met Ile Ala Gly Lys Val Ala Val Ile Cys Gly Tyr Gly Asp
 260 265 270
 Val Gly Lys Gly Cys Ala Ala Ala Met Lys Thr Ala Gly Ala Arg Val
 275 280 285
 Ile Val Thr Glu Ile Asp Pro Ile Cys Ala Leu Gln Ala Met Met Glu
10 290 295 300
 Gly Leu Gln Val Leu Thr Leu Glu Asp Val Val Ser Glu Ala Asp Ile
 305 310 315 320
 Phe Val Thr Thr Thr Gly Asn Lys Asp Ile Ile Met Val Asp His Met
 325 330 335
15 Arg Lys Met Lys Asn Asn Ala Ile Val Cys Asn Ile Gly His Phe Asp
 340 345 350
 Asn Glu Ile Asp Met Gln Gly Leu Glu Thr Phe Pro Gly Val Lys Arg
 355 360 365
 Ile Thr Ile Lys Pro Gln Thr Asp Arg Trp Val Phe Pro Asp Thr Lys
20 370 375 380
 Ser Gly Ile Ile Val Leu Ala Glu Gly Arg Leu Met Asn Leu Gly Cys
 385 390 395 400
 Ala Thr Gly His Pro Ser Phe Val Met Ser Tyr Pro Phe Thr Asn Gln
 405 410 415
25 Val Ile Ala Gln Leu Glu Leu Trp Asn Glu Lys Ser Ser Gly Lys Tyr
 420 425 430
 Glu Lys Lys Val Tyr Val Leu Pro Lys His Leu Asp Glu Lys Val Ala
 435 440 445
 Ala Leu His Leu Gly Lys Leu Gly Ala Lys Leu Thr Lys Leu Thr Lys
30 450 455 460
 Asp Ile
 465

	<210>	12		
	<211>	1752		
	<212>	DNA		
	<213>	Homólogo de Brassica alboglabra (sequência de nucleotídeo)		
5	<400>	12		
	acggggacac acttctctct acccctctct ctgccccaat cttagatccg aaaaaatggc	60		
	gttgatcggt gagaagacgt cgagtggccg tgagtacaag gtcaaggaca tgtctcaggc	120		
	cgacttcggt cgtctcgagc tcgagctcgc cgaagttgag atgccaggac tcatggcttg	180		
	ccgtaccgag ttcgggccag ctgagccctt caaaggcgct agaatacccg gatctctcca	240		
10	catgacgac cagaccgccg tcctcatcga aaccctaacc gccctcggcg cggaagtcag	300		
	atggtgctcc tgcaacatct tctcaaccca agaccacgcc gccgccgcaa tcgcccgtga	360		
	ctccgccgcc gttttcgctt ggaaagggtga gacgcttcag gactactggg ggtgcacgga	420		
	gcgtgctctc gactggggcc cagggtgggtg tccagatctg atcgtcgatg acggtggcga	480		
	cgccacgctt ttgatccacg agggagtga ggccgaggag atctttgaga agacgggtca	540		
15	ggttcctgat ccacttcca ctgacaaccc tgagttccag atcgtgcttt cgatcatcaa	600		
	ggaagggtctc cagggtgatc ctaagaagta ccacaagatg aaggagagac tcgtcggtgt	660		
	ctctgaggag accaccaccg gtgtcaagag gctttaccag atgcaggaaa gtggagccct	720		
	tttgttccca gccattaacg tcaacgactc cgtcaccaag agcaagtctg acaacttgta	780		
	cggttgccgt cactctctac ctgatgggtc catgagggcc actgatgtca tgatcgccgg	840		
20	aaagggttgcg gttatctgtg gttatgggtga tgtcggtgaagg ggttgtgccg ctgccatgaa	900		
	aaccgctggg gctagagtca ttgtgaccga gatcgacccc atctgtgccc tacaagctat	960		
	gatggaaggg cttcaagttc tgacccttga ggatgtcgtc tctgaagctg acatctttgt	1020		
	caccaccacc ggtaacaaag acatcatcat ggttgaccac atgaggaaga tgaagaacaa	1080		
	cgctatcgtc tgcaacattg gtcactttga caacgagatt gacatgcaag gacttgagac	1140		
25	cttccttgga gtgaagcgta tcaccatcaa gcccagacc gacaggtggg tgttcccaga	1200		
	caccaagtcc ggaatcattg ttttggccga gggtcgtctc atgaacttgg gttgtgccac	1260		
	tggtcaccga agtttcgtga tgtcttacct tttcaccaac cagggtgattg ccagcttga	1320		
	gctttggaac gagaagtcga gcggtaagta cgagaagaag gtgtacgttc taccgaagca	1380		
	tttggtatgag aaggttgccg cacttcactt gggcaagctt ggagctaagc tcactaagct	1440		
30	gacaaaggac atctgactag tcagcattcc cattgaagga ccatacaagc ctgctcacta	1500		
	cagggtactga gagaagaatg gagagagcgg tttattttcta gtttggctct ctgatgaagt	1560		
	tgaccgaata tccttctgaa taaggattct tgtcttttga ttgttgtgct tgttcttctt	1620		

```

      ttttctgaat ttatcttgaa acttaaatta gcctttgggtt atttgatttt gtgttggtgtt      1680
      cattgttcta ctctttaaaa aatagaaaca aaaaagttgg ataaaaaaaa aaaaaaaaaa      1740
      aaaaaaaaaa aa                                                                1752

<210>      13
5  <211>      485
    <212>      PRT
    <213>      Homólogo de Petúnia híbrida (sequência de aminoácido), PETCBP
    <400>      13

Met Ala Leu Leu Val Glu Lys Thr Thr Ser Gly Arg Glu Tyr Lys Val
10  1              5              10              15
    Lys Asp Met Ser Gln Ala Asp Phe Gly Arg Leu Glu Ile Glu Leu Ala
              20              25              30
    Glu Val Glu Met Pro Gly Leu Met Ala Cys Arg Thr Glu Phe Gly Pro
              35              40              45
15  Ser Gln Pro Phe Lys Gly Ala Lys Ile Thr Gly Ser Leu His Met Thr
              50              55              60
    Ile Gln Thr Ala Val Leu Ile Glu Thr Leu Thr Ala Leu Gly Ala Glu
    65              70              75              80
    Val Arg Trp Cys Ser Cys Asn Ile Phe Ser Thr Gln Asp His Ala Ala
20              85              90              95
    Ala Ala Ile Ala Arg Asp Ser Ala Ala Val Phe Ala Trp Lys Gly Glu
              100              105              110
    Thr Leu Gln Glu Tyr Trp Trp Cys Thr Glu Arg Ala Leu Asp Trp Gly
              115              120              125
25  Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Ile Val Asp Asp Gly Gly Asp Ala Thr
              130              135              140
    Leu Leu Ile His Glu Gly Val Lys Ala Glu Glu Glu Tyr Ala Lys Asp
    145              150              155              160
    Gly Thr Val Pro Asp Pro Thr Ser Thr Asp Asn Val Glu Phe Gln Leu
30              165              170              175
    Val Leu Gly Ile Ile Lys Glu Ser Leu Lys Thr Asp Pro Thr Lys His
              180              185              190

```

Thr Lys Met Lys Glu Arg Leu Val Gly Val Ser Glu Glu Thr Thr Thr
 195 200 205
 Gly Val Lys Arg Leu Thr Arg Cys Lys Leu Met Glu Leu Cys Phe Ser
 210 215 220
5 Gln Leu Pro Asn Val Asn Asp Ser Val Thr Lys Ser Lys Phe Asp Asn
 225 230 235 240
 Leu Tyr Gly Cys Arg His Ser Leu Pro Asp Gly Leu Met Arg Ala Thr
 245 250 255
 Asp Val Met Ile Ala Gly Lys Val Ala Val Val Ala Gly Tyr Gly Asp
10 260 265 270
 Val Gly Lys Gly Cys Ala Met Ser Leu Lys Gln Ala Gly Ala Arg Val
 275 280 285
 Ile Val Thr Glu Ile Asp Pro Ile Cys Ala Leu Gln Ala Leu Met Glu
 290 295 300
15 Gly Leu Gln Val Leu Thr Leu Glu Asp Val Val Ala Asp Ala Asp Ile
 305 310 315 320
 Phe Val Thr Thr Thr Gly Asn Lys Asp Ile Ile Met Val Asp His Met
 325 330 335
 Arg Lys Met Lys Asn Asn Ala Ile Val Cys Asn Ile Gly His Phe Asp
20 340 345 350
 Asn Glu Ile Asp Met Leu Gly Leu Glu Thr Phe Pro Gly Val Lys Arg
 355 360 365
 Ile Thr Ile Lys Pro Gln Thr Asp Arg Trp Val Phe Pro Asp Thr Asn
 370 375 380
25 Ser Gly Ile Ile Val Leu Ala Glu Gly Arg Leu Met Asn Leu Gly Cys
 385 390 395 400
 Ala Thr Gly His Pro Ser Val Val Met Ser Cys Ser Phe Thr Asn Gln
 405 410 415
 Val Ile Ala Gln Leu Glu Leu Trp Asn Glu Lys Ser Ser Gly Lys Tyr
30 420 425 430
 Glu Lys Lys Val Tyr Val Leu Pro Lys His Leu Asp Glu Lys Val Ala
 435 440 445

Ala Leu His Leu Gly Lys Leu Gly Ala Lys Leu Thr Lys Leu Ser Lys

450

455

460

Asp Gln Ala Asp Tyr Ile Asn Val Pro Val Glu Gly Pro Tyr Lys Pro

465

470

475

480

5

Val His Tyr Arg Tyr

485

<210> 14

<211> 1855

<212> DNA

10

<213> Homólogo de Petúnia híbrida (sequência de nucleotídeo), PETCBP

<400> 14

gcgggggtct cactttcttc ttctctacaa aaaccccatc aagaagtaga gctaaaaaac 60

tccatttcaa taatggcttt acttggttgaa aaaacaacat caggccgtga gtacaagggtt 120

aaagacatgt ctcaggcaga cttcggccgg ctcgaaatcg agttggccga agttgaaatg 180

15

cctggactca tggcttgteg tactgaattt ggaccttcac aaccttttaa aggtgccaaag 240

attactggat ctttacatat gactattcaa actgctgtct tgattgagac tttgacagca 300

ttaggtgctg aagttagatg gtgttcttgt aatatctttt ctactcaaga tcatgctgct 360

gctgctatcg ctcgtgatag cgctgctgtc ttcgcctgga aaggcgagac cttgcaggag 420

tactggtggt gtaccgagag ggcactagat tgggggtccag gtggaggacc tgatttgatt 480

20

gttgatgatg gaggtgacgc tacactcttg attcatgaag gagttaaagc tgaagaagag 540

tatgctaagg atgggacagt cccagatcct acctctaccg ataacgttga gtttcagctt 600

gtgctaggta ttattaagga aagtttaaag actgataccta caaagcatac taagatgaag 660

gaaaggcttg ttggtgtttc tgaggaaact accactgggtg ttaagagact taccagatgc 720

aagctaattgg aactttgctt ttcccagcta cccaatgtta acgactctgt taccaagagc 780

25

aagtttgaca acttgtacgg atgccgccac tcaactgcccg atggtctcat gaaggctact 840

gatgttatga ttgccgga aa gggtgccggt gttgccgggt acggagatgt tggcaaaggg 900

tgtgctatgt ccttgaagca agctggtgcc cgtgtgatcg tgactgagat tgaccacaatc 960

tgtgctctcc aggcctcat ggaaggccta caagttctca ctcttgagga tgttgttgct 1020

gatgctgata tctttgtcac cacaaccggt aacaaggaca tcatcatggt tgaccacatg 1080

30

aggaagatga agaacaatgc cattgtctgc aacattggcc actttgacaa tqaaatcgac 1140

atgcttggtc ttgagacatt cccaggtgtg aagaggatca caatcaagcc tcaaactgac 1200

aggtgggtct tcccagacac caacagtggc atcattgtct tggccgaggg tcgtctcatg 1260

	aacttgggat	gtgccactgg	acacccagct	gtcgtgatgt	cctgttcttt	cactaaccaa	1320
	gtcattgccc	aactcgagtt	gtggaatgag	aagagctctg	gcaagtatga	gaagaagggtg	1380
	tacgtcttgc	caaagcacct	cgacgagaag	gtcgtgccc	ttcaccttgg	aaagctcgga	1440
	gccaaagctta	ccaagctctc	caaggatcaa	gctgactaca	ttaacgtacc	agttgagggt	1500
5	ccttacaagc	cagttcacta	caggtactaa	gggaagacaa	attgacagtg	gagatacatt	1560
	ctcgcggcat	gattgttttg	cttttaatac	tttgattttg	tttaggatac	tagtgttttt	1620
	attattgttg	gggatataatt	gaggggaagt	tgggcatggt	ttgctggaaa	gaaatggtct	1680
	catttgaaag	aaagacctaa	atgtgttgaa	taagatttga	gttatggttg	ggtggtgtgg	1740
	tatgatattg	tagtaagtta	gacccctttg	cgttttggtc	tatgattttt	gtttcaagaa	1800
10	atcagagcta	cattttctct	ttccaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaa	1855
	<210>	15					
	<211>	850					
	<212>	DNA					
	<213>	Construção de HOG1 Antissentido de 850 bp					
15	<400>	15					
	gcgctagaat	caccggatct	ctccacatga	cgatccagac	cgccgtcctc	atcgaaaccc	60
	taaccgccct	cggcgcggaa	gtcagatggt	gctcctgcaa	catcttctca	acccaagacc	120
	acgccgccgc	cgcaatcgcc	cgtgactccg	ccgccgtttt	cgcttgaaa	ggtgagacgc	180
	ttcaggagta	ctggtggtgc	acggagcgtg	ctctcgactg	gggcccaggt	ggtggtccag	240
20	atctgatcgt	cgatgacggt	ggcgacgcca	cgcttttgat	ccacgaggga	gtgaaggccg	300
	aggagatctt	tgagaagacg	ggtcaggttc	ctgatccac	ttccactgac	aaccctgagt	360
	tccagatcgt	gctttcgatc	atcaaggaag	gtctccaggt	tgatcctaag	aagtaccaca	420
	agatgaaggg	gagactcgtc	ggtgtctctg	aggagaccac	caccggtgtc	aagaggcttt	480
	accagatgca	ggaaagtgga	gcccttttgt	tcccagccat	taacgtcaac	gactccgtca	540
25	ccaagagcaa	gttcgacaac	ttgtacggtt	gccgtcactc	tctacctgat	ggtctcatga	600
	gggccactga	tgtcatgac	gccggaaagg	ttgcggttat	ctgtggttat	ggtgatgtcg	660
	gtaaggggtg	tgccgctgcc	atgaaaaccg	ctggtgctag	agtcattgtg	accgagatcg	720
	accccatctg	tgccctacaa	gctatgatgg	aagggttca	agttctgacc	cttgaggatg	780
	togtctctga	agctgacatc	tttgtcacca	ccaccggtaa	caaagacatc	atcatggttg	840
30	accacatgag						850
	<210>	16					
	<211>	15					

	<212>	DNA	
	<213>	Fragmento 1 Antissentido	
	<400>	16	
		ctcggcgcgga aagtc	15
5	<210>	17	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	Fragmento 2 Antissentido	
	<400>	17	
10		tcggcgcgga agtca	15
	<210>	18	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	Fragmento 3 Antissentido	
15	<400>	18	
		cggcgcgga gtcag	15
	<210>	19	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
20	<213>	Fragmento 4 Antissentido	
	<400>	19	
		ggcgcggaag tcaga	15
	<210>	20	
	<211>	9	
25	<212>	DNA	
	<213>	Fragmento 1 de siRNA	
	<400>	20	
		agatccgaa	9
	<210>	21	
30	<211>	9	
	<212>	DNA	
	<213>	Fragmento 2 de siRNA	

	<400>	21	
	gatccgaaa		9
	<210>	22	
	<211>	9	
5	<212>	DNA	
	<213>	Fragmento 3 de siRNA	
	<400>	22	
	atccgaaaa		9
	<210>	23	
10	<211>	9	
	<212>	DNA	
	<213>	Fragmento 4 de siRNA	
	<400>	23	
	tccgaaaaa		9
15	<210>	24	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	Iniciador PET1	
	<400>	24	
20	aagatgccct ggactctact atggtcactt		30
	<210>	25	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	Iniciador PET2	
25	<400>	25	
	tcagaacttg ctcttggttag acag		24
	<210>	26	
	<211>	432	
	<212>	PRT	
30	<213>	Homosapiens (sequência de aminoácido), SAHH	
	<400>	26	
	Met Ser Asp Lys Leu Pro Tyr Lys Val Ala Asp Ile Gly Leu Ala Ala		

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

	260	265	270
	Val Thr Thr Thr Gly Cys Ile Asp Ile Ile Leu Gly Arg His Phe Glu		
	275	280	285
	Gln Met Lys Asp Asp Ala Ile Val Cys Asn Ile Gly His Phe Asp Val		
5	290	295	300
	Glu Ile Asp Val Lys Trp Leu Asn Glu Asn Ala Val Glu Lys Val Asn		
	305	310	315 320
	Ile Lys Pro Gln Val Asp Arg Tyr Arg Leu Lys Asn Gly Arg Arg Ile		
	325	330	335
10	Ile Leu Leu Ala Glu Gly Arg Leu Val Asn Leu Gly Cys Ala Met Gly		
	340	345	350
	His Pro Ser Phe Val Met Ser Asn Ser Phe Thr Asn Gln Val Met Ala		
	355	360	365
	Gln Ile Glu Leu Trp Thr His Pro Asp Lys Tyr Pro Val Gly Val His		
15	370	375	380
	Phe Leu Pro Lys Lys Leu Asp Glu Ala Val Ala Glu Ala His Leu Gly		
	385	390	395 400
	Lys Leu Asn Val Lys Leu Thr Lys Leu Thr Glu Lys Gln Ala Gln Tyr		
	405	410	415
20	Leu Gly Met Ser Cys Asp Gly Pro Phe Lys Pro Asp His Tyr Arg Tyr		
	420	425	430
	<210> 27		
	<211> 485		
	<212> PRT		
25	<213> Homólogo de Lycopersicon esculentum (sequência de aminoácido)		
	<400> 27		
	Met Ala Leu Leu Val Glu Lys Thr Thr Ser Gly Arg Glu Tyr Lys Val		
	1 5 10 15		
	Lys Asp Met Ser Gln Ala Asp Phe Gly Arg Leu Glu Ile Glu Leu Ala		
30	20 25 30		
	Glu Val Glu Met Pro Gly Leu Met Ala Ser Arg Ala Glu Phe Gly Pro		
	35 40 45		

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

	Gly Leu Gln Val Leu Phe Leu Glu Asp Val Val Ser Glu Val Asp Ile	
	305	310 315 320
	Phe Val Thr Thr Thr Gly Asn Lys Asp Ile Ile Met Val Asp His Met	
		325 330 335
5	Arg Lys Met Lys Asn Asn Ala Ile Val Cys Asn Ile Gly His Phe Asp	
	340	345 350
	Asn Glu Ile Asp Met His Gly Leu Glu Thr Phe Pro Gly Val Lys Arg	
	355	360 365
	Ile Thr Ile Lys Pro Gln Thr Asp Arg Trp Val Phe Pro Asp Thr Asn	
10	370	375 380
	Ser Gly Ile Ile Val Leu Ala Glu Gly Arg Leu Met Asn Leu Gly Cys	
	385	390 395 400
	Ala Thr Gly His Pro Ser Phe Val Met Ser Cys Ser Phe Thr Asn Gln	
	405	410 415
15	Val Ile Ala Gln Leu Glu Leu Trp Asn Glu Arg Ser Ser Gly Lys Tyr	
	420	425 430
	Glu Lys Lys Val Tyr Val Leu Pro Lys His Leu Asp Glu Lys Val Ala	
	435	440 445
	Ala Leu His Leu Gly Lys Phe Gly Ala Lys Leu Thr Lys Leu Thr Lys	
20	450	455 460
	Asp Gln Ala Asp Tyr Ile Tyr Val Pro Val Glu Gly Pro Tyr Lys Pro	
	465	470 475 480
	Ala His Tyr Arg Tyr	
	485	
25	<210>	28
	<211>	1754
	<212>	DNA
	<213>	Homólogo de Lycopersicon esculentum (sequência de nucleotídeo)
	<400>	28
30	tctcagatct catcttaaac cttttttttt ctcttatact cgccttacct atggctctac	60
	tcgttgagaa gaccacctct ggccgcgagt acaagggtgaa ggacatgtct caggctgact	120
	tcggcaggct cgaaatcgag cttgctgaag ttgaaatgcc tggctctcatg gcttcacggg	180

	ctgaatttgg gccttcacag cccgttaaag gtgcaaagat cacttggttct ttgcatatga	240
	ctatccaaac tgctttcctg attgaaaccc taactgcttt ggggtgctgaa gttagatggg	300
	gttcttgcaa catcttctca actcaggacc atgctgcagc agccattgca cgtgacagtg	360
	ctgctgtctt tgccctgaaa ggtgagactt tgcaggagta ctggtggtgt actgagaggg	420
5	cacttgactg ggggtccagggt ggtggtcctg atctgattgt tgatgatgga ggtgatgcta	480
	ctctgttgat tcatgaggga gttaaggctg aagaggagt tgcctaagaat ggaacagtcc	540
	cagatcccac ttctactgac aatgttgagt ttcaacttgt gcttactatt attaaggaga	600
	gcttaaagac tgatccatta aggtacacta agatgaagga gagacttggt ggtgtttctg	660
	agaaaactac cactggtgtt aagaagcttt accaaatgcc agctaatagga tctttgcttt	720
10	tcttgcctat caatgttaat gactctgtta ccaagagcaa gtttgacaac ttgtatggat	780
	gccgccactc acttcccgat ggtctcatga gggctactga tgttatgatt gctggaaagg	840
	ttgctcttgt tgctggttat ggagatgtcg gcaagggatg tgctgctgcc atgaaacaag	900
	ctggtgcccg tgtgattgtg actgagattg acccaatctg tgctctccag gctaccatgg	960
	aaggccttca ggttttgttc ttggaggatg ttgtttctga ggttgatatc tttgtgacca	1020
15	ccaccggtaa caaggacatc atcatgggtg accacatgag gaagatgaag aacaatgcc	1080
	ttgtctgcaa cattggtcac ttgacaacg aaatcgacat gcatggctctt gaaaccttcc	1140
	ctggtgtgaa gaggatcaca atcaagccac aaaccgacag atgggtcttt cccgacacca	1200
	acagtggcat cattgtgttg gccgagggtc gtctcatgaa cttgggatgt gccactggac	1260
	accccagttt tgtgatgtct tgctctttca ctaaccaagt cattgcccaa ctcgagttgt	1320
20	ggaatgagag gagcagtggc aaatacgaga agaagggtgta cgtcttgcca aagcaccttg	1380
	acgagaaggt tgctgccctt catcttgaa agttcggagc caagcttacc aaactcacca	1440
	aggatcaagc tgactacatt tacgtacctg ttgagggtcc ttacaagcct gctcactaca	1500
	ggtactgagg aagagacgct cacagtggaa caacgatacg gcggcatgat tgttttgttt	1560
	taaactttta ttttgtttag gtagtgtgtt ttatatttgt tgggggatat tttgctggaa	1620
25	agttgaccta aatgtgtttg aataatattt gaattatggt tgggggtggtg tcatatgata	1680
	ttgtaccaag ttagattcat ttgctttctt gtttctataa aatttgcttc aaggaaacaa	1740
	agcatcatgt tttt	1754
	<210> 29	
	<211> 484	
30	<212> PRT	
	<213> Homólogo de Solanum tuberosum (sequência de aminoácido)	
	<400> 29	

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

Asp Val Met Ile Ala Gly Lys Val Ala Leu Val Ala Gly Tyr Gly Asp
 260 265 270
 Val Gly Lys Gly Cys Ala Ala Ala Met Lys Gln Ala Gly Ala Arg Val
 275 280 285
5 Ile Val Thr Glu Ile Asp Pro Ile Cys Ala Leu Gln Ala Thr Met Glu
 290 295 300
 Gly Leu Gln Val Leu Pro Leu Glu Asp Val Val Ser Glu Val Asp Ile
 305 310 315 320
 Phe Val Thr Thr Thr Gly Asn Lys Asp Ile Ile Met Val Asp His Met
10 325 330 335
 Arg Lys Met Lys Asn Asn Ala Ile Val Cys Asn Ile Gly His Phe Asp
 340 345 350
 Asn Glu Ile Asp Met His Gly Leu Glu Thr Phe Pro Gly Val Lys Arg
 355 360 365
15 Ile Thr Ile Ser Ser Asn Asp Arg Trp Val Phe Pro Asp Thr Asn Ser
 370 375 380
 Gly Ile Ile Val Leu Ala Glu Gly Arg Leu Met Asn Leu Gly Cys Ala
 385 390 395 400
 Thr Gly His Pro Ser Phe Val Met Ser Cys Ser Phe Thr Asn Gln Val
20 405 410 415
 Ile Ala Gln Leu Glu Leu Trp Asn Glu Arg Ser Ser Gly Lys Tyr Glu
 420 425 430
 Lys Lys Val Tyr Val Leu Pro Lys His Leu Asp Glu Lys Val Ala Ala
 435 440 445
25 Leu His Leu Gly Lys Leu Gly Ala Lys Leu Thr Lys Leu Thr Lys Asp
 450 455 460
 Gln Ala Asp Tyr Ile Ser Val Pro Val Glu Gly Pro Tyr Lys Pro Ala
 465 470 475 480
 His Tyr Arg Tyr
30
 <210> 30
 <211> 1738

<212> DNA

<213> Homólogo de *Solanum tuberosum* (sequência de nucleotídeo)

<400> 30

	aaggaagaag agaaaagctc tcagatctca tctcaaacc tttcatttct cttatactcg	60
5	ccttaccat ggctctactc gttgagaaga ccacctctgg ccgcgagtac aaggtgaagg	120
	acatgtccca ggcagacttc ggcaggctcg aaatcgagct tgccgagggt gaaatgcctg	180
	gtctcatggc ttcccgtact gaattcggcc cttcacagcc ctttaaagggt gcaaagatca	240
	ctggatctct gcatatgact atccaaactg ctgtccttat tgaaacccta actgcttttg	300
	gtgctgaagt tagatggtgt tcttgcaaca tcttctcaac tcaggacctat gctgcagcag	360
10	ccattgcacg tgatagtgtc gctgtttttg cctggaaagg tgagactttg caggagtact	420
	ggtggtgtac tgagagggca cttgattggg gtccagggtg tggtcctgat ctgattgttg	480
	atgatggagg tgatgctact ctcttgattc atgagggagt taaggcagag gaagagtgtg	540
	ctaagaatgg gacaatccca gatcctactt ctactgacaa tgttgagttt caacttgtgc	600
	ttactattat taaggagagc ttaaagactg atcctttaag gtacactaag atgaaggaga	660
15	gacttggttg tgtttctgag gaaactacca ctgggtgtta gaggcctttac caaatgcagg	720
	ctaattggaac tttgctattc cctgctatca atgttaatga ctctgttacc aagagcaagt	780
	ttgacaactt gtatggatgc cgccactcac tgccctgatgg tctcatgagg gctactgatg	840
	ttatgattgc cgggaagggt gctcttggtg ctgggttatgg agatgtcggc aagggatgtg	900
	ctgctgccat gaaacaagct ggtgcccgtg tgattgtgac tgagattgat ccaatctgtg	960
20	ctcttcaggc aaccatggaa ggactccagg ttcttcctct tgaggatgtt gtttctgagg	1020
	ttgatattct tgtgaccacc actggtaaca aggacatcat catggttgac cacatgagga	1080
	agatgaagaa caatgccatt gtctgcaaca ttggtcactt tgacaatgaa atcgacatgc	1140
	atggtcttga gaccttcctt ggtgtgaaga ggatcacaat cagctcaaac gacagatggg	1200
	tcttcccaga caccaacagt ggcatcattg tcttgccga gggtcgtctc atgaacttgg	1260
25	gatgtgccac tggacacccc agttttgtga tgtcttgctc tttcactaac caagtcattg	1320
	cgcaactcga gttgtggaat gagaggagca gtggcaaata cgagaagaag gtgtacgtct	1380
	tgccaaaaca cctcgatgag aagggttgctg cccttcatct tggaaagctc ggagccaagc	1440
	tcaccaaact taccaaggat caagctgact acatcagcgt accagttgag ggtccttaca	1500
	agcctgctca ctacaggtac tgaggggaaga gacactcatg gtggaacaac gatatcacgg	1560
30	cacgattgtt ttgtttttta tactttgatt ttgttttaggt agtgtgtttt tattattgtt	1620
	gggggcaagt tggcatgttt tgctggcacg ttgcacctaa atgtgtttgc aatcatcatt	1680
	cgaattcatg gtgttggggg tgtgtcatct gcatattgta ctcaagcatt catttgca	1738

FIG. 1

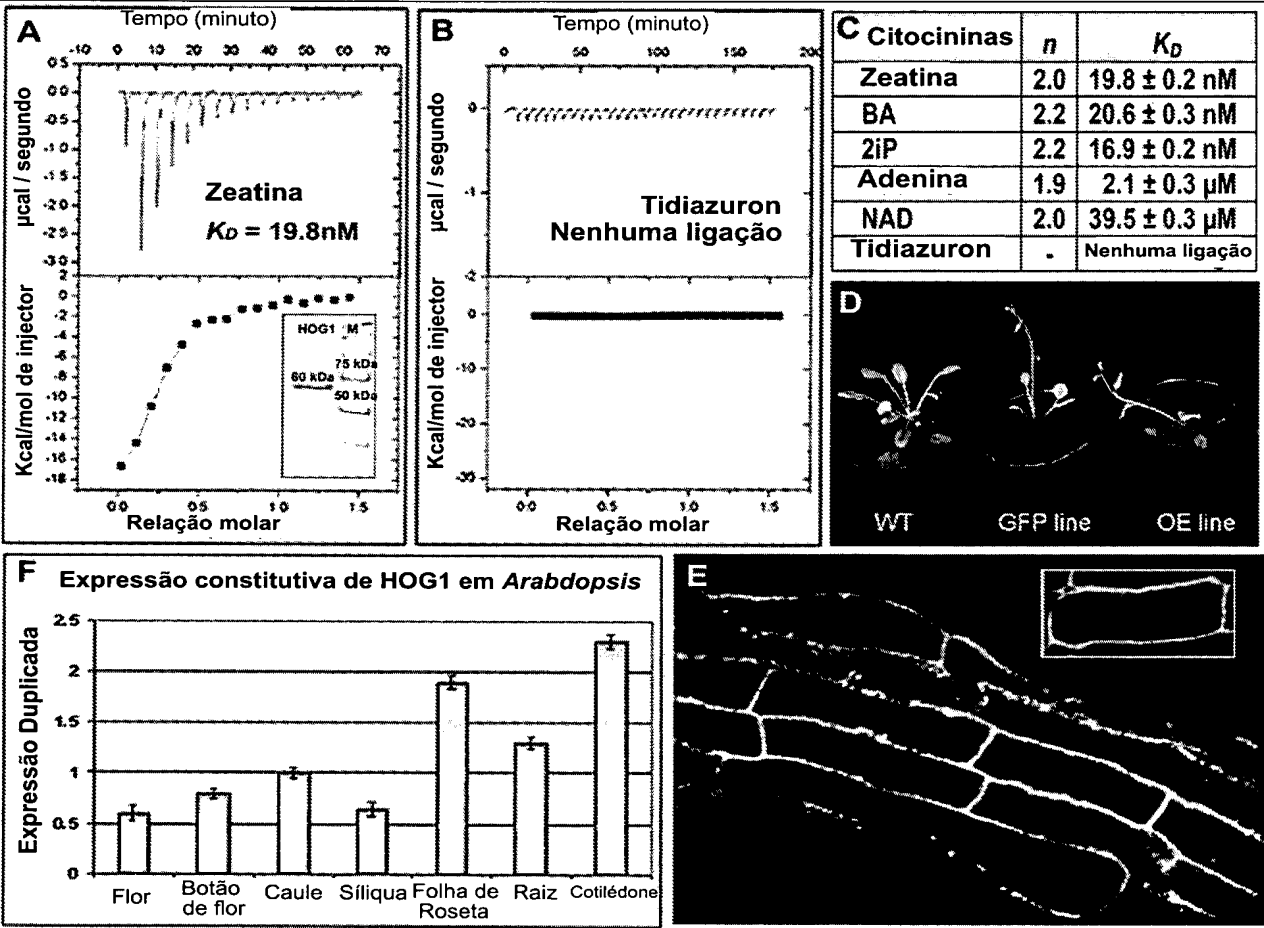


FIG. 2

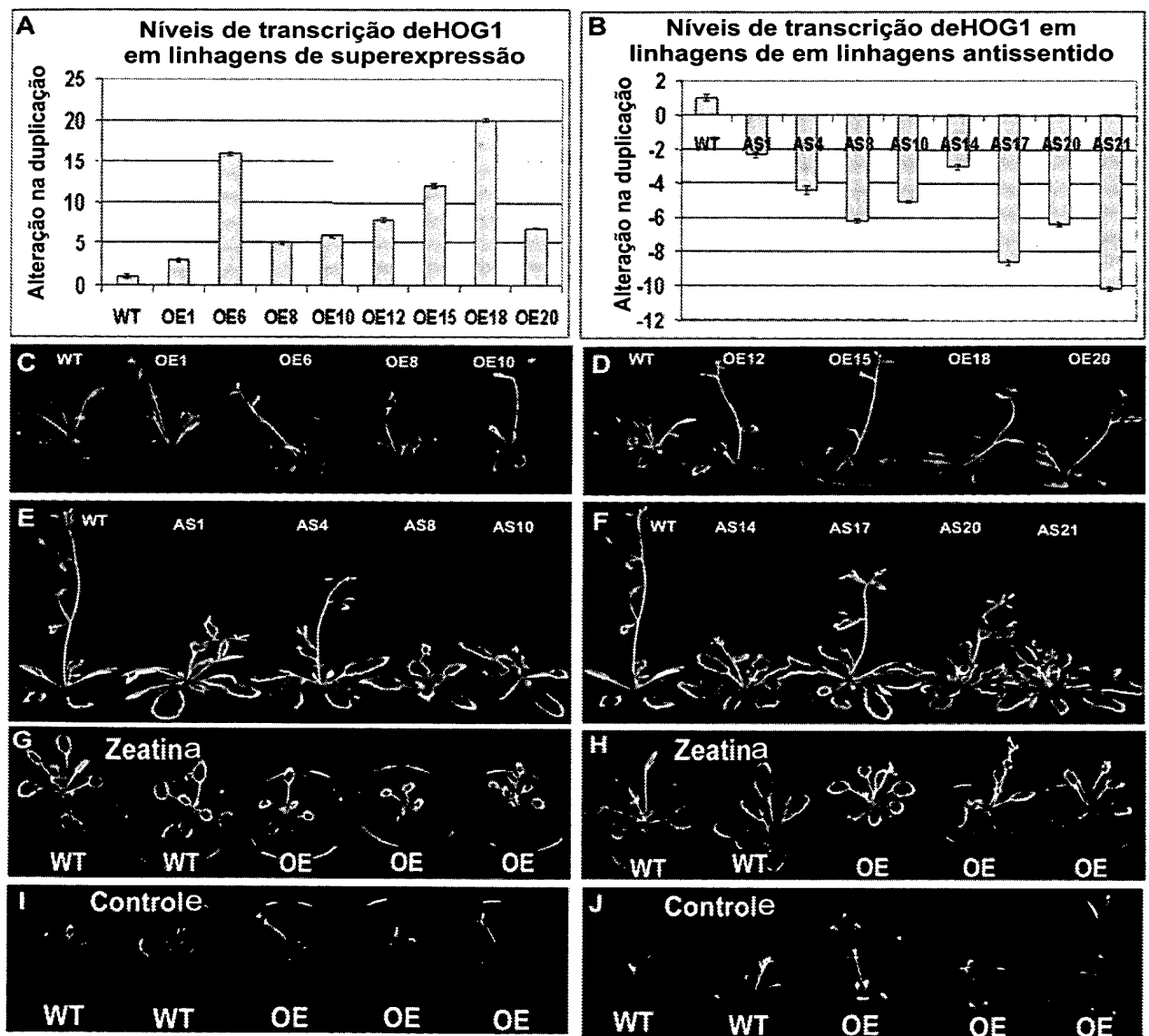


FIG. 3

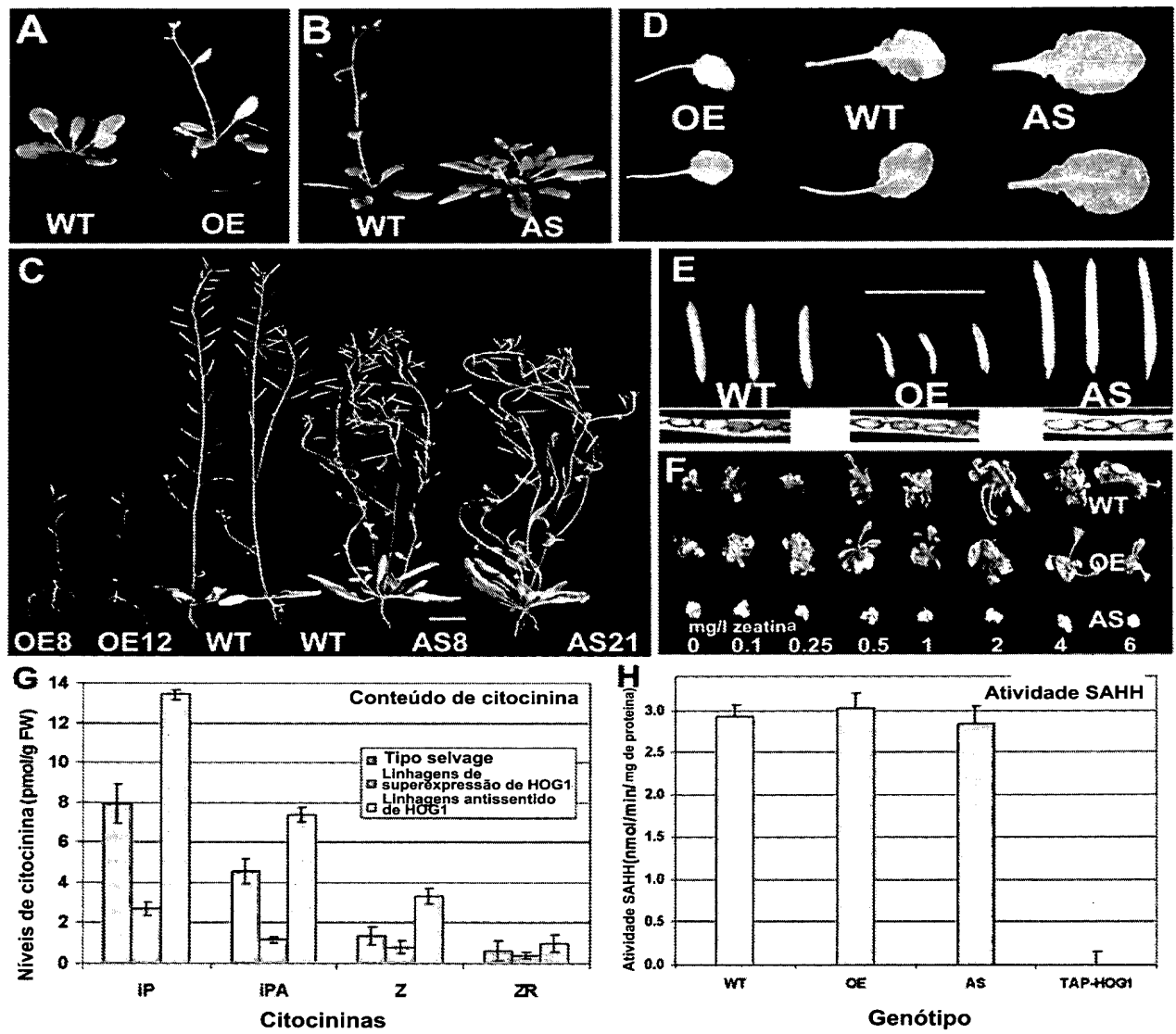


FIG. 4

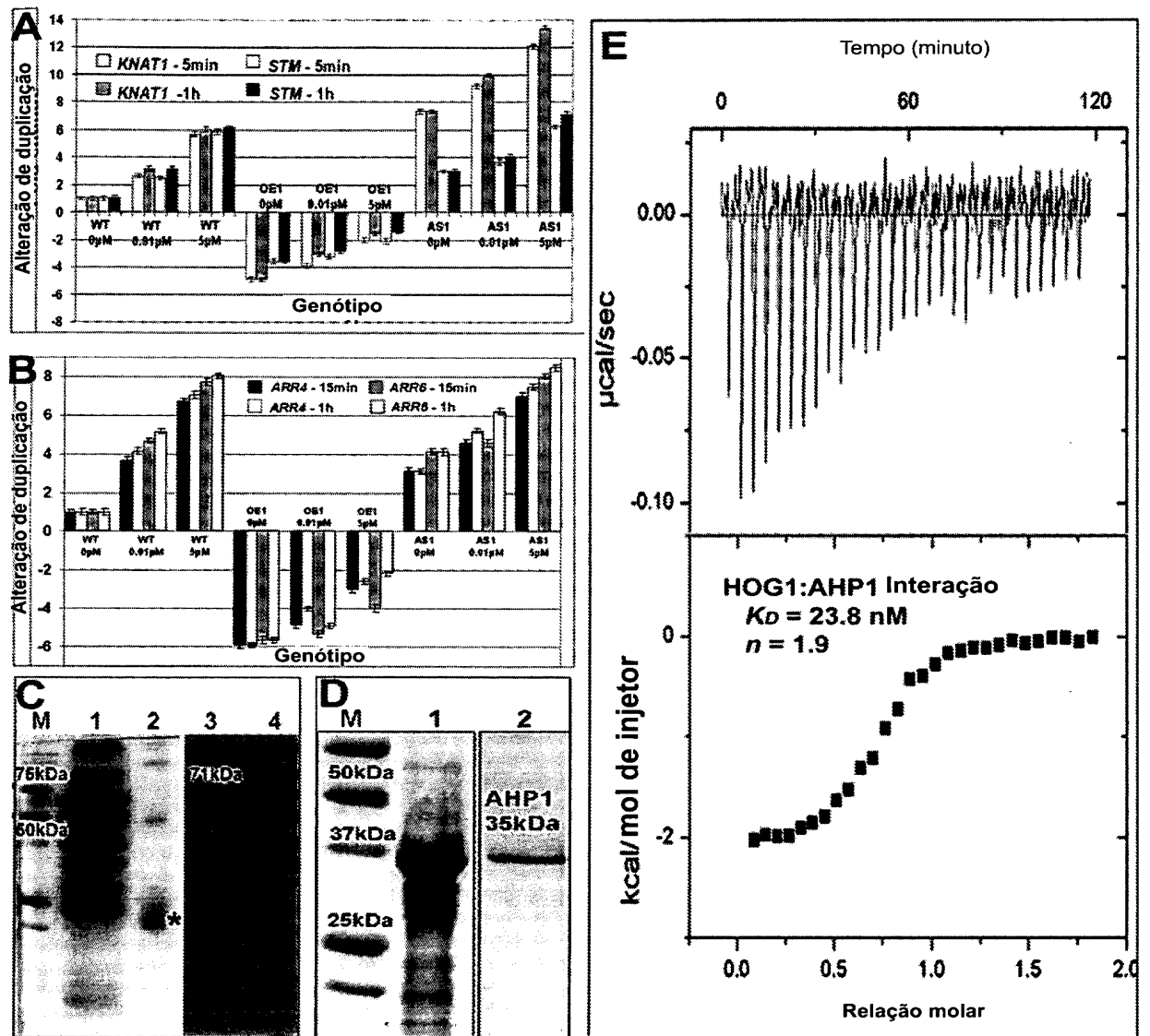
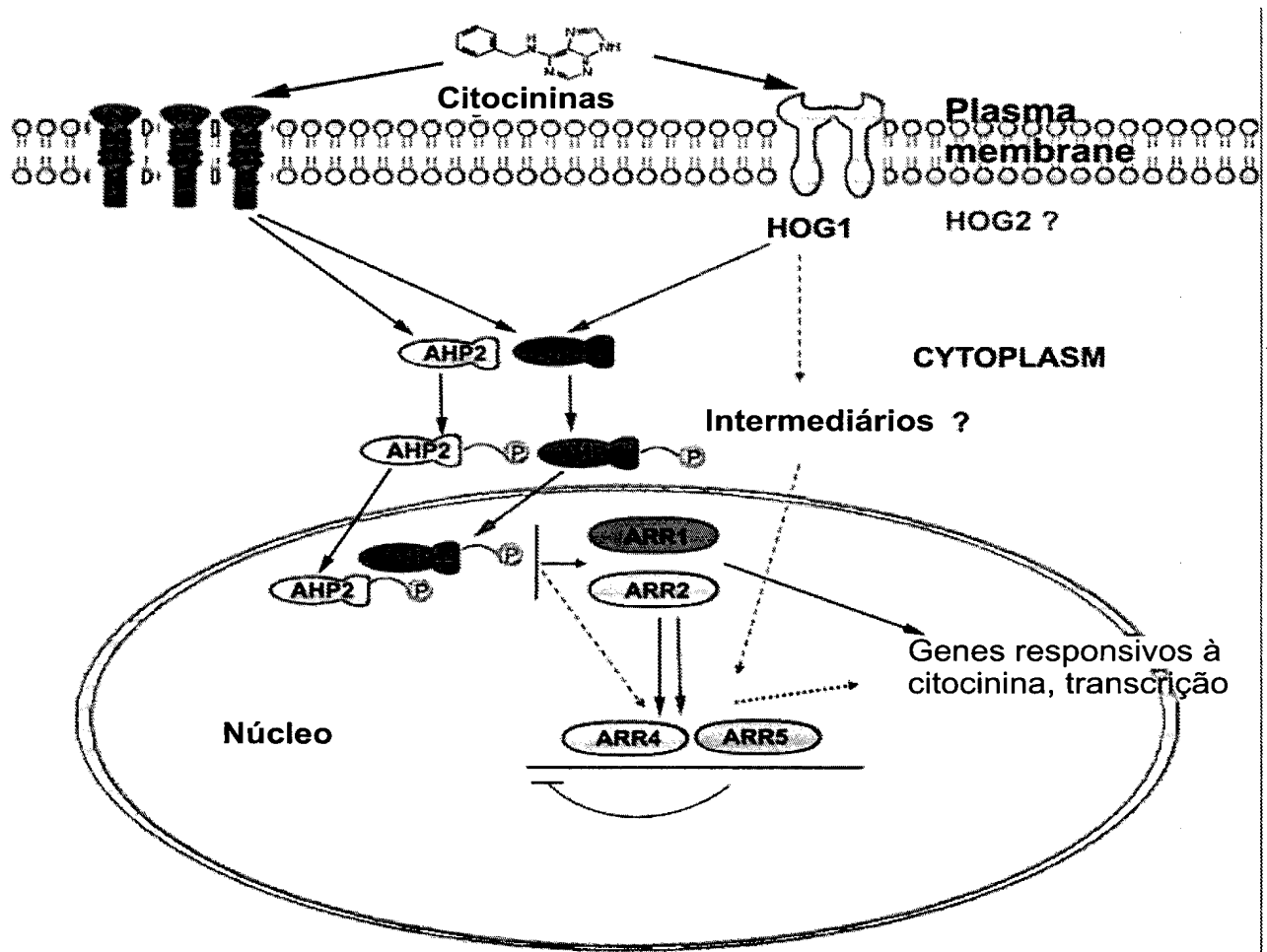


FIG. 5



* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

SAHH 1ª Assinatura

* : * : * : *** * : ***** : : :

SAHH 2ª Assinatura

***** * . ***** . * *****

* .*****.*****. * . ***** **

FIG. 6 (Cont.)

HOG2	HLDEKVAALHLGKLGARLTKLTKDQSDYVSIPVEGPKPVHYRY
HOG1 (SEQ ID:1)	HLDEKVAALHLGKLGAKLTKLTKDQSDYVSIPIEGPKPPHYRY
Petúnia híbrida (SEQ ID:13)	HLDEKVAALHLGKLGAKLTKLSKDQADYINVPVEGPKPVHYRY
Nicotiana tabacum (SEQ ID:3)	HLDEKVAALHLGKLGAKLTKLSKDQADYISVPVEGPKPAHYRY
Orzya sativa (SEQ ID:5)	HLDEKVAALHLGKLGARLTKLSKSQADYISVPVEGPKPAHYRY
Triticum aestivum (SEQ ID:7)	HLDEKVAALHLGKLGARLTKLTKSQSDYISIPVEGPKLRLYRY
Homo sapiens (SEQ ID:26)	KLDEAVAEHLGKLNVKLTKLTEKQAQYLGMSCDGPFKPDHYRY

: ***:* :*****:***:***:..

:**:..*:*****

FIG. 7

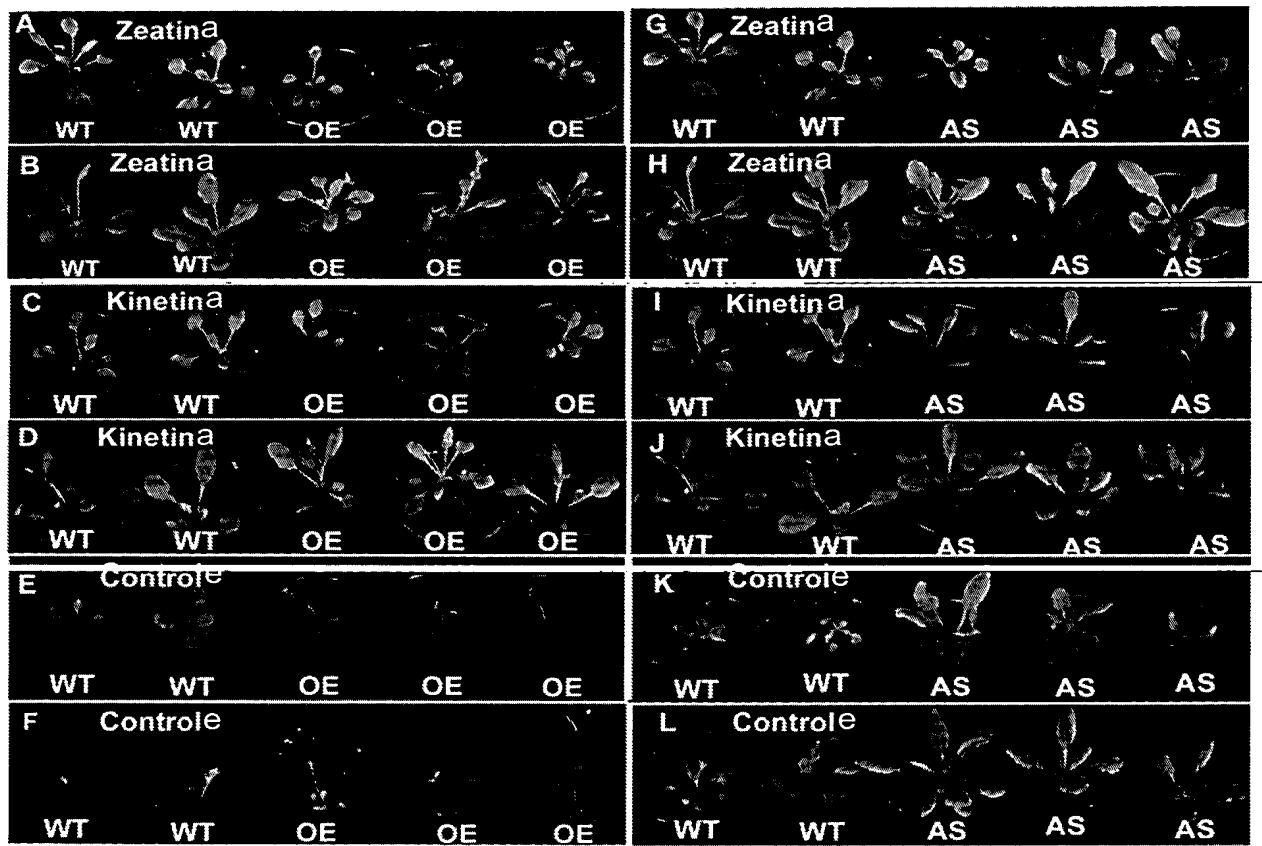


FIG. 8

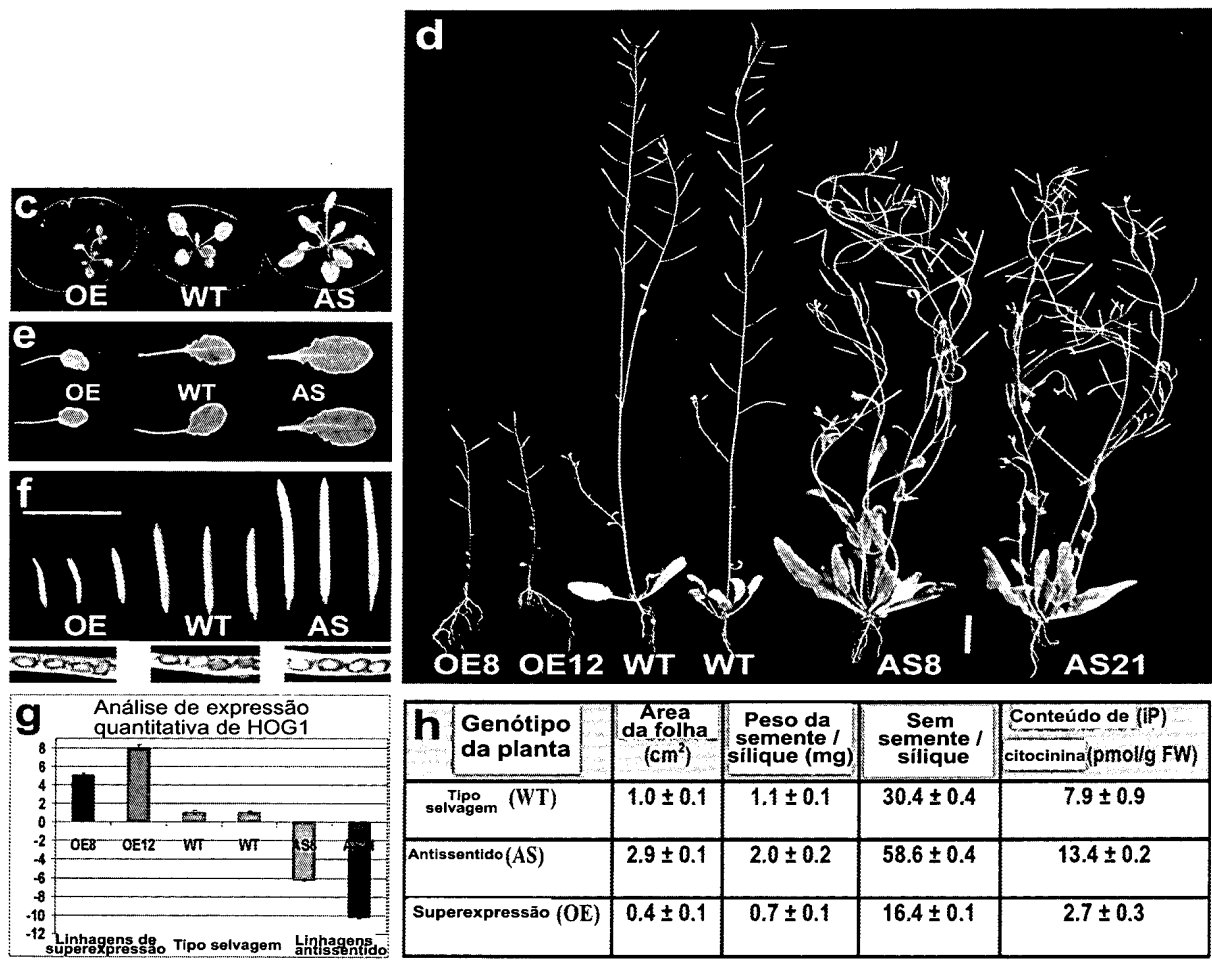


FIG. 9

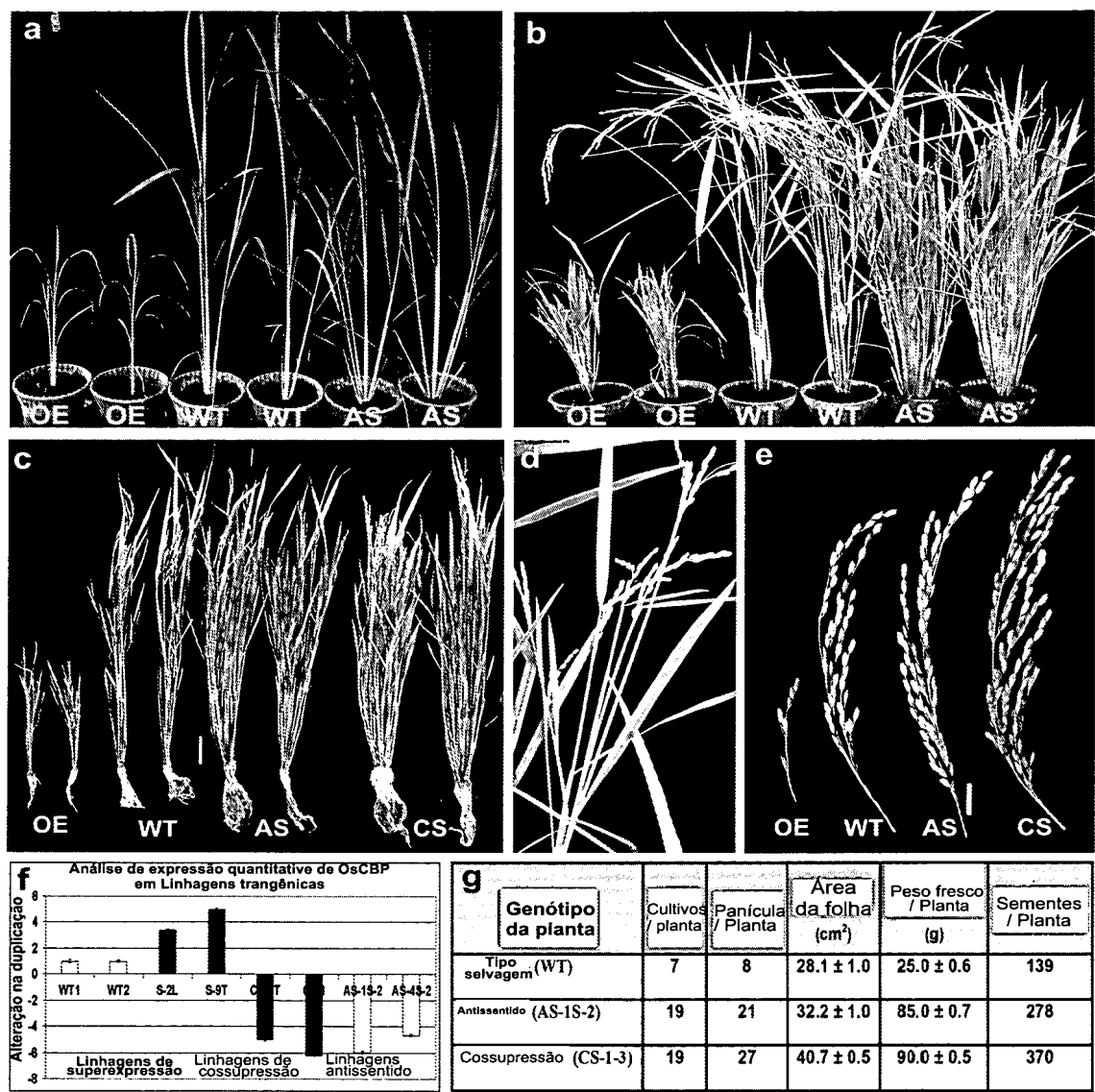


FIG. 10

a

SEQ ID:1	MALIVEKTSGGREYKVKDMSQADFGRLELELAEVEMPGLMACRTEFGPAQPFKGARITGS
SEQ ID:5	MALSVEKTSGGREYKVKDLSQADFGRLEIELAEVEMPGLMACRAEFGPSQPFKGARISGS
SEQ ID:13	MALLVEKTTSGREYKVKDMSQADFGRLEIELAEVEMPGLMACRTEFGPSQPFKGAKITGS
SEQ ID:1	LHMTIQTAVLIETLTALGAEVRWCSCNIFSTQDHAAAAIARDSAAVFAWKGETLQEYWWC
SEQ ID:5	LHMTIQTAVLIETLTALGAEVRWCSCNIFSTQDHAAAAIARDSAAVFAWKGETLEEYWWC
SEQ ID:13	LHMTIQTAVLIETLTALGAEVRWCSCNIFSTQDHAAAAIARDSAAVFAWKGETLQEYWWC
SEQ ID:1	TERALDWGPGGGPDLIVDDGGDATLLIHEGVKAEEIFEKTGQVPDPTSTDNPEFQIVLSI
SEQ ID:5	TERCLDWGVGGGPDLIVDDGGDATLLIHEGVKAEEFEKSGKVPDPESTDNAEFKIVLTI
SEQ ID:13	TERALDWGPGGGPDLIVDDGGDATLLIHEGVKAEEYAKDGTVPDPTSTDNVEFQLVLGI
SEQ ID:1	IKEGLQVDPKKYHKMKGRLVGVSEETTTGVKRLYQMQUESGALLFPAINVND SVTKSKFDN
SEQ ID:5	IRDGLKSDPSKYRKMKERLVGVSEETTTGVKRLYQMQUETGALLFPAINVND SVTKSKFDN
SEQ ID:13	IKESLKTDPKHTKMKERLVGVSEETTTGVKRLTRCKLMELCFSQLPNVND SVTKSKFDN
SEQ ID:1	LYGCRHSLPDGLMRATDVMIAQKVAVICGYGDVGKGC AAAMKTAGARVIVTEIDPICALQ
SEQ ID:5	LYGCRHSLPDGLMRATDVMIAQKVA VVCGYGDVGKGC AAALKQAGARVIVTEIDPICALQ
SEQ ID:13	LYGCRHSLPDGLMRATDVMIAQKVA VVAGYGDVGKGC AMSLKQAGARVIVTEIDPICALQ
SEQ ID:1	AMMEGLQVLTLEDVVSEADIFVTTTGNKDIIMVDHMRKMKNNAIVCNIGHFDNEIDMQGL
SEQ ID:5	ALMEGLQVLTLEDVVSEADIFVTTTGNKDIIMVDHMRKMKNNAIVCNIGHFDNEIDMLGL
SEQ ID:13	ALMEGLQVLTLEDVVADADIFVTTTGNKDIIMVDHMRKMKNNAIVCNIGHFDNEIDMLGL
SEQ ID:1	ETFPGVKRITIKPQTDRWVFPDTKSGIIVLAEGRLMNLGCATGHPSFVMSCSFTNQVIAQ
SEQ ID:5	ETYPGVKRITIKPQTDRWVFPETNTGIIIVLAEGRLMNLGCATGHPSFVMSCSFTNQVIAQ
SEQ ID:13	ETYPGVKRITIKPQTDRWVFPDTNSGIIIVLAEGRLMNLGCATGHPSVVMSCSFTNQVIAQ
SEQ ID:1	LELWNEKSSGKYEKKVYVLPKHLDEKVAALHLGKLGAKLTKLTKDQSDYVSIPIEGPYKP
SEQ ID:5	LELWKEKSTGKYEKKVYVLPKHLDEKVAALHLGKLGARLTKLSKSQADYISVPVEGPYKP
SEQ ID:13	LELWNEKSSGKYEKKVYVLPKHLDEKVAALHLGKLGAKLTKLSKDQADYINVPVEGPYKP
SEQ ID:1	PHYRY
SEQ ID:5	AHYRY
SEQ ID:13	VHYRY

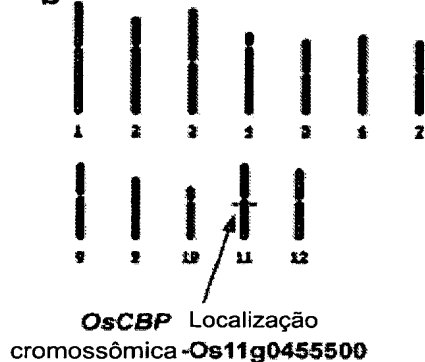
b

FIG. 11

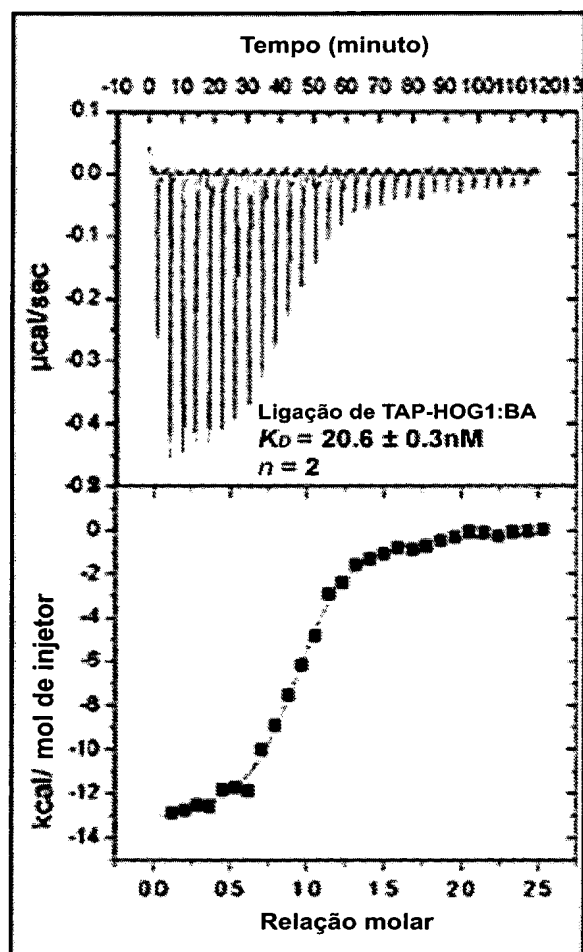
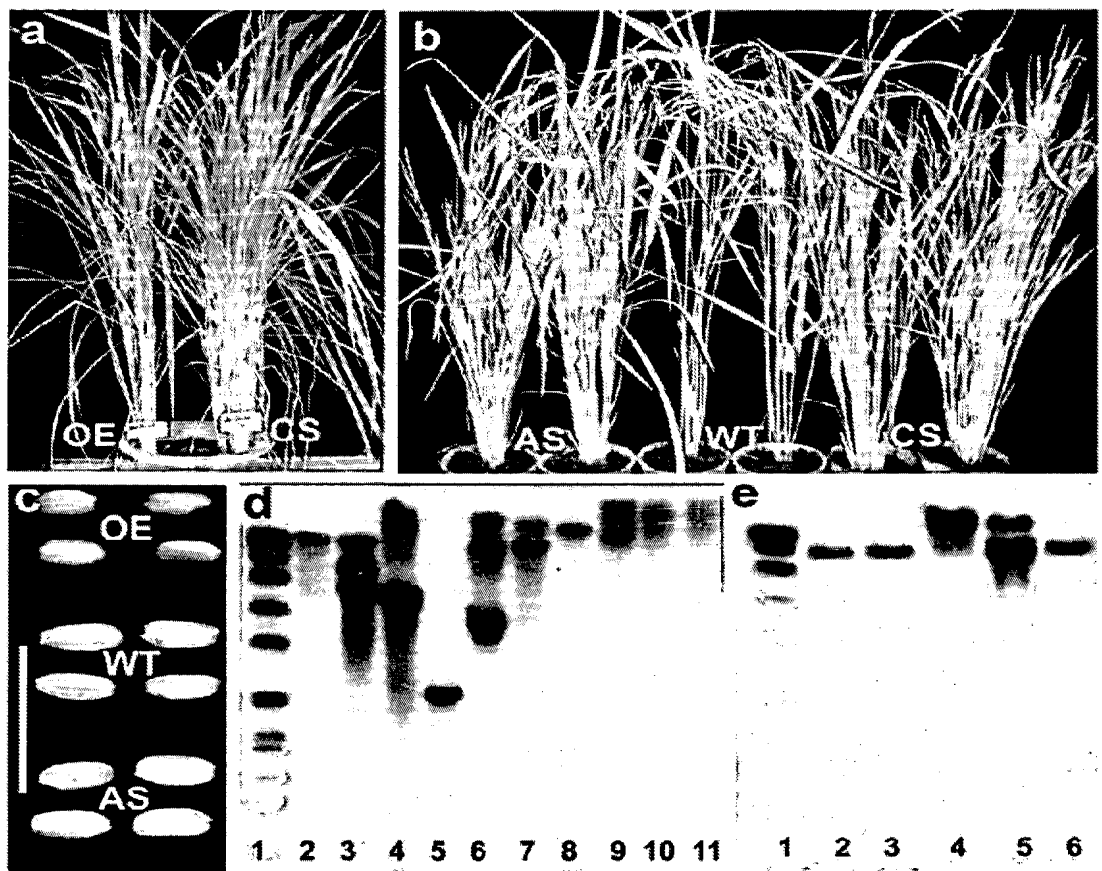


FIG. 12



RESUMO

Patente de Invenção: **"RECEPTOR DE QUITOCINA PUTATIVA E MÉTODOS PARA USO DO MESMO".**

Método de modular a expressão de pelo menos uma característica em uma planta, o método compreendendo a etapa de modulação da expressão de pelo menos um polipeptídeo pela planta, em que o polipeptídeo é selecionado do grupo que consiste em: i) um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:1; ii) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que é selecionada do grupo que consiste em qualquer um ou mais do aminoácido 1 a aminoácido 7, de aminoácido 9 a aminoácido 230, de aminoácido 1 a aminoácido 58, de aminoácido 77 a aminoácido 485, de aminoácido 59 a aminoácido 76, de aminoácido 150 a aminoácido 191, de aminoácido 231 a aminoácido 405, e de aminoácido 406 a aminoácido 438 de SEQ ID NO: 1, ou em posições equivalentes em um homólogo dos mesmos, e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta; iii) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:1 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta; e iv) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:1, em que a modulação da expressão do polipeptídeo modula a expressão de pelo menos uma característica na planta.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de modular a expressão de pelo menos uma característica em uma planta, o método compreendendo a etapa de modulação da expressão de pelo menos um polipeptídeo pela planta, em que o polipeptídeo é selecionado do grupo que consiste em:

i) um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:1;

ii) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que é selecionada do grupo que consiste em qualquer um ou mais do aminoácido 9 a aminoácido 230, de aminoácido 1 a aminoácido 58, de aminoácido 77 a aminoácido 485, de aminoácido 59 a aminoácido 76, de aminoácido 231 a aminoácido 405, e de aminoácido 406 a aminoácido 438 de SEQ ID NO: 1, ou em posições equivalentes em um homólogo dos mesmos, e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta;

iii) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:1 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta; e

iv) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:1, em que a modulação da expressão do polipeptídeo modula a expressão de pelo menos uma característica na planta.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a etapa de modulação da expressão de pelo menos um polipeptídeo pela planta compreende introduzir em uma ou mais células da planta polinucleotídeo que modula a expressão do polipeptídeo.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a etapa de modulação da expressão do polipeptídeo compreende reduzir a expressão do polipeptídeo.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que a etapa de redução da expressão do polipeptídeo pela planta compreende introduzir em uma ou mais células da planta polinucleotídeo que reduz a expressão do

polipeptídeo.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, em que o polipeptídeo é selecionado do grupo que consiste em:

- i) polinucleotídeo antissense que compreende a sequência de
5 ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15;
- ii) polinucleotídeo antissense que compreende pelo menos 15
resíduos de ácido nucleico contíguos selecionados da sequência de ácido
nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15;
- iii) polinucleotídeo antissense que compreende pelo menos 15
10 resíduos de ácido nucleico contíguos de polinucleotídeo que é complementar
a uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que com-
preende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade
de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID
NO: 1;
- iv) polinucleotídeo de interferência de RNA que compreende
15 uma sequência de ácido nucleico compreendendo pelo menos 9 resíduos de
ácido nucleico contíguos selecionados da sequência de ácido nucleico que é
complementar a polinucleotídeo consistindo na sequência de ácido nucleico
de acordo com a SEQ ID NO: 15; e
- v) polinucleotídeo antissense que consiste na sequência de áci-
do nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 80% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo
25 com a SEQ ID NO: 1 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 85% de identidade de sequência para uma sequência de
30 aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a

6, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 90% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta.

5 9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 95% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que é capaz de modular a sinalização de citoquinina na planta.

10 10. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a etapa de modulação da expressão do polipeptídeo compreende aumentar a expressão do polipeptídeo.

 11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que a etapa de aumentar a expressão do polipeptídeo pela planta compreende introduzir
15 em uma ou mais células da planta polinucleotídeo que aumenta a expressão do polipeptídeo.

 12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que o polipeptídeo é selecionado do grupo que consiste em:

 i) polinucleotídeo que compreende uma sequência de ácido nu-
20 cleico que codifica um polipeptídeo de SEQ ID NO: 1,

 ii) polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que é selecionada do grupo que consiste em qualquer um ou mais do aminoácido 9 a aminoácido 230, de aminoácido 1 a aminoácido 58, de aminoácido 77 a aminoácido 485, de aminoácido 59 a
25 aminoácido 76, de aminoácido 231 a aminoácido 405, e de aminoácido 406 a aminoácido 438 de SEQ ID NO: 1, ou em posições equivalentes em um homólogo dos mesmos, e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta; e

 iii) polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende
30 uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta.

13. Método de qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que a pelo menos uma característica em uma planta é selecionada do grupo que consiste em qualquer um de altura da planta, biomassa da planta, desenvolvimento de botão apical, ramificação, fertilidade, florescimento, área da folha, senescência, germinação de semente, produção de semente, peso de semente, desenvolvimento de tronco, produção de grão, número de cultivos, desenvolvimento de meristema floral e desenvolvimento de raiz.

14. Método de acordo com a reivindicação 3, em que a modulação de pelo menos uma característica é selecionada do grupo que consiste em qualquer um de ramificação aumentada, produção de semente aumentada, biomassa da planta aumentada, produção de grão aumentada, número de cultivos aumentado, área da folha aumentada, germinação de semente retardada, predominância apical diminuída, florescimento retardado, ou combinações dos mesmos na planta com relação a uma planta do mesmo tipo em que a expressão do polipeptídeo não foi modulada.

15. Método de acordo com a reivindicação 10, em que a modulação de pelo menos uma característica é selecionada do grupo que consiste em qualquer um de florescimento precoce, nanismo, número diminuído de folhas, senescência precoce, germinação de semente precoce, formação retardada e reduzida de folhas de roseta, crescimento de raiz de muda aumentado, ou combinações dos mesmos na planta, com relação a uma planta do mesmo tipo em que a expressão do polipeptídeo não foi modulada.

16. Polinucleotídeo isolado selecionado do grupo que consiste em:

i) polinucleotídeo antissense que compreende a sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15;

ii) polinucleotídeo antissense que compreende pelo menos 15 resíduos de ácido nucleico contíguos selecionados da sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15; e

iii) polinucleotídeo antissense que compreende pelo menos 15 resíduos de ácido nucleico contíguos de polinucleotídeo que é complementar a uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que com-

preende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:1;

iv) polinucleotídeo de interferência de RNA compreendendo uma
5 sequência de ácido nucleico que compreende pelo menos 9 resíduos de ácido nucleico contíguos selecionados da sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15; e

v) polinucleotídeo antissense que consiste na sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15;
10 em que o polinucleotídeo é capaz de diminuir a expressão de um polipeptídeo que modula pelo menos uma característica em uma planta, ou

vi) polinucleotídeo que é complementar a qualquer um de i) a v),
ou

vii) polinucleotídeo que hibridiza sob condições rigorosas para
15 qualquer um de i) a v).

17. Polinucleotídeo isolado selecionado do grupo que consiste em:

i) polinucleotídeo que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de SEQ ID NO:1;

20 ii) polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que é selecionada do grupo que consiste em qualquer um ou mais do aminoácido 9 a aminoácido 230, de aminoácido 1 a aminoácido 58, de aminoácido 77 a aminoácido 485, de aminoácido 59 a aminoácido 76, de aminoácido 231 a aminoácido 405, e de aminoácido 406
25 a aminoácido 438 de SEQ ID NO: 1, ou em posições equivalentes em um homólogo dos mesmos, e que é capaz de modular sinalização de citoquinina em uma planta;

iii) polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:1
30 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina em uma planta; e

iv) polinucleotídeo que consiste em uma sequência de ácido nu-

cleico que codifica um polipeptídeo de SEQ ID NO:1;

em que o polinucleotídeo é capaz de aumentar a expressão de um polipeptídeo que modula pelo menos uma característica em uma planta, ou

v) polinucleotídeo que é complementar a qualquer um de i) a iv);

5 ou

vi) polinucleotídeo que hibridiza sob condições rigorosas para qualquer um de i) a iv).

18. Vetor compreendendo polinucleotídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 16 ou 17.

10 19. Célula hospedeira transformada com um vetor como definido na reivindicação 18.

20. Planta compreendendo uma célula hospedeira como definido na reivindicação 19.

15 21. Método de produzir uma planta transgênica compreendendo as etapas de:

(a) fornecer polinucleotídeo que module a expressão de um polipeptídeo, em que o polipeptídeo é selecionado do grupo que consiste em:

i) um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:1;

20 ii) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido que é selecionada do grupo que consiste em qualquer um ou mais de aminoácido 9 a aminoácido 230, de aminoácido 1 a aminoácido 58, de aminoácido 77 a aminoácido 485, de aminoácido 59 a aminoácido 76, de aminoácido 231 a aminoácido 405, e de aminoácido 406 a aminoácido 438 de
25 SEQ ID NO: 1, ou em posições equivalentes em um homólogo dos mesmos, e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta;

iii) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:1 e que é capaz de modular
30 sinalização de citoquinina na planta; e

iv) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:1;

(b) transformar uma planta, parte da planta ou célula da planta com o polinucleotídeo de etapa (a), e

(c) cultivar a planta transformada, parte da planta ou célula da planta para produzir a planta transgênica.

5 22. Método de acordo com a reivindicação 21, em que o polipeptídeo na etapa (a) compreende polinucleotídeo isolado selecionado do grupo que consiste em:

v) Polinucleotídeo antissense que compreende a sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15;

10 vi) Polinucleotídeo antissense que compreende pelo menos 15 resíduos de ácido nucleico contíguos selecionados da sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15; e

 vii) Polinucleotídeo antissense que compreende pelo menos 15
15 resíduos de ácido nucleico contíguos de polinucleotídeo que é complementar a uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:1;

 viii) Polinucleotídeo de interferência de RNA compreendendo
20 uma sequência de ácido nucleico que compreende pelo menos 9 resíduos de ácido nucleico contíguos selecionados da sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15; e

 ix) Polinucleotídeo antissense que consiste na sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO: 15;

25 em que o polinucleotídeo é capaz de modular a expressão de um polipeptídeo que modula pelo menos uma característica em uma planta, ou

 x) um polinucleotídeo que é complementar a qualquer um de i) a v), ou

 xi) um polinucleotídeo que hibridiza sob condições rigorosas para qualquer um de i) a v).

30

 23. Método de acordo com a reivindicação 21, em que o polipeptídeo na etapa (a) compreende polinucleotídeo isolado selecionado do grupo

que consiste em:

i) polinucleotídeo que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de SEQ ID NO:1,

ii) polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende
 5 uma sequência de aminoácido que é selecionada do grupo que consiste em qualquer um ou mais do aminoácido 9 a aminoácido 230, de aminoácido 1 a aminoácido 58, de aminoácido 77 a aminoácido 485, de aminoácido 59 a aminoácido 76, de aminoácido 231 a aminoácido 405, e de aminoácido 406 a aminoácido 438 de SEQ ID NO: 1, ou em posições equivalentes em um
 10 homólogo dos mesmos, e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta;

iii) polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:1
 15 e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta; e

iv) polinucleotídeo que consiste em uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de SEQ ID NO:1, em que o polinucleotídeo é capaz de aumentar a expressão de um polipeptídeo que modula pelo menos uma característica em uma planta, ou

20 v) polinucleotídeo que é complementar a qualquer um de i) a iv), ou

vi) polinucleotídeo que hibridiza sob condições rigorosas para qualquer um de i) a iv).

24. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 21
 25 a 23, em que o cultivo na etapa (c) é cultivando a planta transformada, parte da planta ou célula da planta sob condições que permitem o crescimento da planta transformada, parte da planta ou célula da planta.

25. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 24, em que a parte da planta é selecionada do grupo que consiste em raiz, tronco, folha, botão, flor, broto, semente e galho.
 30

26. Planta de acordo com a reivindicação 20, em que a planta é uma planta monocotiledônea ou uma planta dicotiledônea.

27. Planta de acordo com a reivindicação 20 ou 26, em que a planta é selecionada do grupo que consiste em aveia, cevada, trigo, centeio, milho, arroz, sorgo, milho miúdo, amaranto, grama-do-reino, grama doce, cana, bambu, grama de forragem, capim diamante e capim turfa.

5 28. Planta transgênica quando produzida pelo método de qualquer uma das reivindicações 21 a 25, em que a planta é selecionada do grupo que consiste em aveia, cevada, trigo, centeio, milho, arroz, sorgo, milho miúdo, amaranto, grama-do-reino, grama doce, cana, bambu, grama de forragem, capim diamante e capim turfa.

10 29. Planta transgênica quando produzida pelo método de qualquer uma das reivindicações 21 a 25, em que a planta é capaz de produzir plantas férteis.

30. Parte ou a semente de uma planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 29.

15 31. Parte de acordo com a reivindicação 30, em que a parte é selecionada do grupo que consiste em raiz, tronco, folhas, botão, flor, broto, semente, tubérculo, fruto e galho.

32. Planta ou material de propagação regenerado da mesma de uma planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 a 29, ou uma
20 parte ou uma semente de acordo com a reivindicação 30 ou 31.

33. Uso de uma planta transformada com polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 16 ou 17 para biomassa da produção da planta.

34. Uso de acordo com a reivindicação 33, em que a planta é selecionada do grupo que consiste em aveia, cevada, trigo, centeio, milho,
25 arroz, sorgo, milho miúdo, amaranto, grama-do-reino, grama doce, cana, bambu, grama de forragem, capim diamante e capim turfa.

35. Uso de acordo com a reivindicação 33 ou 34, em que a biomassa da produção da planta é para a produção de biocombustível.

36. Polipeptídeo isolado selecionado do grupo que consiste em:
30 i) um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:1;

ii) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoá-

cido que é selecionada do grupo que consiste em qualquer um ou mais do aminoácido 9 a aminoácido 230, de aminoácido 1 a aminoácido 58, de aminoácido 77 a aminoácido 485, de aminoácido 59 a aminoácido 76, de aminoácido 231 a aminoácido 405, e de aminoácido 406 a aminoácido 438 de
 5 SEQ ID NO: 1, ou em posições equivalentes em um homólogo dos mesmos, e que é capaz de modular sinalização de citoquinina em uma planta;

iii) um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para A sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:1 e que é capaz de modular sinali-
 10 zação de citoquinina em uma planta; e

iv) um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO:1,
 em que a modulação da expressão do polipeptídeo modula a expressão de pelo menos uma característica na planta.

15 37. Método de modular a expressão de pelo menos uma característica em uma planta, o método compreendendo a etapa de modulação da expressão de pelo menos um polipeptídeo pela planta, em que o polipeptídeo é um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido com pelo menos 70% de identidade de sequência para uma sequência de amino-
 20 ácido de acordo com a SEQ ID NO:1, em que a referida sequência de aminoácido compreende uma sequência de aminoácido de aminoácido 59 a aminoácido 76 de SEQ ID NO:1, ou em posições equivalentes em um homólogo dos mesmos, e que é capaz de modular sinalização de citoquinina na planta, em que a modulação da expressão do polipeptídeo modula a expres-
 25 são de pelo menos uma característica na planta.

38. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido que tem pelo menos 97,5% de identidade de sequência para uma sequência de aminoácido de acordo com a SEQ ID NO: 1 e que é capaz de modular sinalização de cito-
 30 quinina na planta.