



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

(21) PI 0719111-1 A2



(22) Data de Depósito: 22/11/2007

(43) Data da Publicação: 10/12/2013

(RPI 2240)

(51) Int.Cl.:

A01N 43/54

A01G 7/06

A01P 21/00

C07D 239/84

C07D 405/12

C12Q 1/02

G01N 33/15

G01N 33/50

C07K 14/415

C12N 15/09

(54) Título: AGENTE PAR INIBIR A SINALIZAÇÃO DE CITOCININA **(57) Resumo:**

(30) Prioridade Unionista: 22/11/2006 JP 2006-315308, 22/11/2006 JP 2006-315309, 01/02/2007 JP 2007-022849, 01/02/2007 JP 2007-022850, 01/02/2007 JP 2007-022849, 22/11/2006 JP 2006-315308, 22/11/2006 JP 2006-315309, 01/02/2007 JP 2007-022849

(73) Titular(es): Sumitomo Chemical Company, Limited

(72) Inventor(es): Asako Nagasawa, Hideki Uneme, Yuto Arata

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

(86) Pedido Internacional: PCT JP2007073126 de 22/11/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/062907 de 29/05/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"AGENTE PARA INIBIR A SINALIZAÇÃO DE CITOCININA"**.

Campo técnico

5 A presente invenção refere-se a um agente que tem uma atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta e controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta, e similares.

Antecedente da Técnica

10 Citocinina é um hormônio da planta envolvido na divisão celular e diferenciação da plantas mais altas, e é uma substância biologicamente ativa importante que é conhecida para exercer ações tais como indução de divisão celular da planta mais altas, diferenciação de calo ou medula à folhagem, prevenção de etiolação de folhas, folhas caídas e fruta caída, e anulação da dominância apical (Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function, 15 CRC Press (1994)). Como um método de controlar fenômenos fisiológicos causados por citocinina, um método compreendendo produzir citocinina do exterior, um método compreendendo controlar biogênese de citocinina em um corpo da planta, um método compreendendo controlar metabolismo de citocinina em um corpo da planta e similares foi proposto.

20 Uma substância química que serve como o ingrediente ativo de um regulador de crescimento da planta foi convencionalmente encontrada por avaliação randomizada em que uma substância química de teste é diretamente contatada com uma planta e em seguida uma atividade biológica da planta é testada. Neste caso, depois que uma substância química tendo uma 25 atividade biológica útil é determinada, é necessário intensivamente estudar que tipo de mecanismo de ação há para a substância química mostrar seu efeito e o que é alvejado pela substância química no nível molecular, para prognosticar a segurança e carga no ambiente da substância química.

Descrição de Invenção

30 Um objetivo da presente invenção é fornecer um agente capaz de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta, e um método para procurar uma substância química tendo uma atividade biológica útil cujo

alvo tornou-se claro, isto é, um método para avaliar uma substância química utilizando uma atividade em um alvo específico como um indicador para quimicamente controlar um sítio alvo. Especificamente, um objetivo da presente invenção é fornecer um agente que tem uma atividade de inibir a sinalização intracelular a partir de um receptor de citocinina derivado da planta e controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta, e um método para procurar uma substância química que sirva como um ingrediente ativo do agente.

Desse modo, a presente invenção fornece;

- (1) agente capaz de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta que tem uma atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula;
- (2) o agente de acordo com o anterior (1), em que o agente capaz de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta é um regulador de crescimento da planta;
- (3) o agente de acordo com o anterior (1), em que o agente capaz de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta é um agente capaz de controlar o crescimento de um corpo da planta;
- (4) o agente de acordo com o anterior (1), em que o agente capaz de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta é um agente capaz de controlar a diferenciação de uma célula da planta;
- (5) o agente de acordo com o anterior (3), em que o agente capaz de controlar o crescimento de uma planta é um agente capaz de controlar o crescimento de um broto de uma planta;
- (6) o agente de acordo com o anterior (5), em que controla do crescimento de um broto de uma planta é inibição do crescimento de um broto axilar;
- (7) o agente de acordo com o anterior (5), em que controle do crescimento de um broto de uma planta é inibição do crescimento de um broto de flor;
- (8) o agente de acordo com o anterior (3), em que o agente capaz de controlar o crescimento de um corpo da planta é um agente capaz de promover o estabelecimento de resistência de uma planta;
- (9) o agente de acordo com o anterior (3), em que o agente capaz de contro-

lar o crescimento de um corpo da planta é um agente capaz de promover o cultivo de uma planta;

(10) o agente de acordo com o anterior (3), em que o agente capaz de controlar o crescimento de um corpo da planta é um agente capaz de promover

5 o crescimento de uma raiz de uma planta;

(11) o agente de acordo com qualquer um dos anterior (1) a (10), em que o receptor de citocinina derivado da planta de uma célula é um receptor de citocinina selecionado a partir do seguinte grupo A:

<Grupo A>

10 (a) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1,
(b) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido SEQ ID NO:1 em que um ou mais aminoácidos são deletados, adicionados ou substituídos, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina,
(c) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido tendo uma

15 identidade de sequência de 45% ou mais com a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina

(d) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2

20 (e) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada por um polinucleotídeo que hibridiza sob uma condição estrita com um polinucleotídeo complementar a um polinucleotídeo tendo a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina;

25 (12) o agente de acordo com qualquer um dos anterior (1) a (10), em que a atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula é uma atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina selecionado a partir do seguinte grupo A em um sistema de contato de uma célula tendo o receptor de citocinina com
30 uma substância tendo uma atividade agonística ao receptor de citocinina;

<Grupo A>

(a) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1,

- (b) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido SEQ ID NO:1 em que um ou mais aminoácidos são deletados, adicionados ou substituídos, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina,
 - (c) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido tendo uma
- 5 identidade de sequência de 45% ou mais com a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina
- (d) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2
- 10 (e) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada por um polinucleotídeo que hibridiza sob uma condição estrita com um polinucleotídeo complementar a um polinucleotídeo tendo a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina;
- 15 (13) um regulador de crescimento da planta compreendendo uma substância química capaz de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo, como um ingrediente ativo;
- (14) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (13), em
- 20 que a substância química tem uma atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina selecionado a partir do seguinte grupo A em um sistema de contato compreendendo uma célula tendo o receptor de citocinina, uma substância tendo uma atividade agonística ao receptor de citocinina, e a substância química;
- 25 <Grupo A>
- (a) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1,
- (b) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido SEQ ID NO:1 em que um ou mais aminoácidos são deletados, adicionados ou substituídos, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina,
- 30 (c) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido tendo uma identidade de sequência de 45% ou mais com a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de cito-

cinina

(d) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2

(e) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada por um polinucleotídeo que hibridiza sob uma condição estrita com um polinucleotídeo complementar a um polinucleotídeo tendo a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina;

(15) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (14), em que a substância tendo uma atividade agonística ao receptor de citocinina é trans-zeatina;

(16) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (13), em que a substância química tem uma atividade de baixar a sinalização intracelular de um receptor de citocinina selecionado a partir do seguinte grupo A em um sistema de contato compreendendo uma célula tendo o receptor de citocinina, 0,6 ppm de trans-zeatina e 2 ppm da substância química, quando comparado com o caso onde a substância química não está presente no sistema de contato;

<Grupo A>

(a) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1,

(b) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido SEQ ID NO:1 em que um ou mais aminoácidos são deletados, adicionados ou substituídos, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina,

(c) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido tendo uma identidade de sequência de 45% ou mais com a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina

(d) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2

(e) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada por um polinucleotídeo que hibridiza sob uma condição estrita com um polinucleotídeo complementar a um polinucleotídeo tendo a sequência de nu-

cleotídeo de SEQ ID NO:2, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina;

(17) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (13), em que a substância química tem uma atividade de baixar a sinalização intracelular de um receptor de citocinina selecionado a partir do seguinte grupo A em 90% ou mais em um sistema de contato compreendendo uma célula tendo o receptor de citocinina, 0,6 ppm de trans-zeatina e 2 ppm da substância química, quando comparado com o caso onde a substância química não está presente no sistema de contato;

10 <Grupo A>

(a) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1,

(b) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido SEQ ID NO:1 em que um ou mais aminoácidos são deletados, adicionados ou substituídos, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina,

15 (c) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido tendo uma identidade de sequência de 45% ou mais com a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina

(d) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2

20 (e) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada por um polinucleotídeo que hibridiza sob uma condição estrita com um polinucleotídeo complementar a um polinucleotídeo tendo a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina;

(18) um método para procurar uma substância química capaz de promover o crescimento de uma raiz de uma planta, que compreende:

30 <1> uma primeira etapa de medir a quantidade de sinalização intracelular de um receptor de citocinina selecionado a partir do seguinte grupo A em um sistema de contato compreendendo uma célula tendo o receptor de citocinina, uma substância tendo uma atividade agonística ao receptor de citocinina e uma substância teste; e

<2> uma segunda etapa de selecionar uma substância química capaz de promover o crescimento de uma raiz de uma planta na base de uma diferença obtida comparando-se a quantidade de sinalização intracelular medida na primeira etapa com a quantidade de sinalização intracelular na ausência da substância química;

5

<Grupo A>

(a) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1,

(b) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido SEQ ID NO:1 em que um ou mais aminoácidos são deletados, adicionados ou substitu-

10

tuídos, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina,

(c) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido tendo uma identidade de sequência de 45% ou mais com a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina

15

(d) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2

(e) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada por um polinucleotídeo que hibridiza sob uma condição estrita com um polinucleotídeo complementar a um polinucleotídeo tendo a sequência de nu-

20

cleotídeo de SEQ ID NO:2, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina;

(19) o método minucioso de acordo com o anterior (18), em que a célula tendo o receptor de citocinina é uma célula transformada em que um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeo codificando a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1 é introduzido;

25

(20) o método minucioso de acordo com o anterior (18), em que a célula tendo o receptor de citocinina é uma célula de levedura transformada em que um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeo codificando a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1 é introduzido;

30

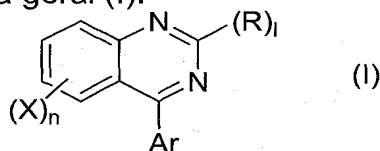
(21) o método minucioso de acordo com o anterior (18), (19) ou (20), em que a substância tendo uma atividade agonística ao receptor de citocinina é trans-zeatina;

(22) um regulador de crescimento da planta compreendendo uma substância química selecionada pelo método minucioso de acordo com o anterior (18), (19), (20) ou (21), ou um sal agricolamente aceitável do mesmo, como um ingrediente ativo;

5 (23) um método de regulamento de crescimento da planta, que compreende aplicar uma quantidade eficaz do regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (13), (14), (15), (16), (17) ou (22) a uma planta ou um hábitat da planta;

(24) um método de regulamento de crescimento da planta compreendendo
10 determinar uma substância química capaz de promover o crescimento de uma raiz de uma planta pelo método minucioso de acordo com o anterior (18), (19), (20) ou (21), e trazendo a substância química capaz de promover o crescimento de uma raiz de uma planta desse modo determinada em contato com uma planta;

15 (25) um regulador de crescimento da planta compreendendo um composto representado pela fórmula geral (I):



em que R e X são os mesmos ou diferentes e representam um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído, um grupo representado por NR^1R^2 , um grupo representado por OR^3 , um grupo representado por $\text{S}(\text{O})_m\text{R}^4$, um grupo
20 nitro ou um átomo de halogênio, em que R^1 representa um átomo de hidrogênio ou um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído,

R^2 representa um átomo de hidrogênio, um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído, um grupo representado por NR^5R^6 (em que R^5 e R^6 são os mesmos ou diferentes e representam um átomo de hidrogênio ou um
25 grupo $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituído) ou um grupo representado por OR^7 (em que R^7 representa um átomo de hidrogênio ou um grupo $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquila opcionalmente substituído), ou R^1 e R^2 são empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados para formar um grupo amino cíclico opcionalmente substituído,

R^3 e R^4 cada qual representa um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído,

l representa um número inteiro de 0 a 1,

m representa um número inteiro de 0 a 2,

5 n representa um número inteiro de 0 a 4,

quando n for 2 ou mais, cada X é o mesmo ou diferente um do outro, e

Ar representa um grupo arila opcionalmente substituído ou um grupo heteroarila opcionalmente substituído; ou um sal agricolamente aceitável do mesmo, como um ingrediente ativo;

10 (26) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (25), em que l é 1 e R é um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído;

(27) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (25), em que l é 1 e R é um grupo C1-3 alquila que é opcionalmente substituído com (a) átomo(s) de halogênio ou (um) grupo(s) oxo;

15 (28) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (26), em que o grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído é um grupo C1-3 alquila que é opcionalmente substituído com (a) átomo(s) de halogênio ou (um) grupo(s) oxo;

(29) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (25), em que l é 1 e R é um grupo representado por NR^1R^2 ;

(30) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (29), em que R^1 representa um átomo de hidrogênio ou um grupo C1-3 alquila, R^2 representa um átomo de hidrogênio, um grupo amino, um grupo C1-3 alquilamino, um grupo di C1-3 alquilamino, um grupo amidino, um grupo C1-3 alcóxi, um grupo fenila, um grupo C1-3 acila, um grupo C1-6 alquila, um grupo C3-6 alquenila ou um grupo C3-6 alquinila em que o grupo fenila é opcionalmente substituído com 1 a 3 os mesmos ou diferentes grupos C1-3 alquila, o grupo fenila, o grupo acila, o grupo alquila, o grupo alquenila e o grupo alquinila são opcionalmente substituídos com 1 a 3 os mesmos ou diferentes substituintes selecionados a partir de um átomo de halogênio, um grupo hidroxila, um grupo C1-3 alcóxi, um grupo hidróxi C1-3 alcóxi, um grupo carboxila, um grupo C1-3 alcoxicarbonila, um grupo carbamoila, um grupo ami-

25

30

no, um grupo C1-3 alquilamino, um grupo di C1-3 alquilamino, um grupo mercapto, um grupo C1-3 aciltio, um grupo ciano, um grupo furila e um grupo tetra-hidrofurila, ou R^1 e R^2 são empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados para formar um grupo pirrolidino, um grupo piperidino ou um grupo morfolino;

(31) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (29), em que R^1 representa um átomo de hidrogênio, R^2 representa um átomo de hidrogênio, um grupo formila, um grupo C1-6 alquila, um grupo C3-6 alquenila ou um grupo C3-6 alquinila em que o grupo alquila, o grupo alquenila e o grupo alquinila são opcionalmente substituídos com (a) substituinte(s) selecionado a partir de um grupo hidroxila, um grupo metóxi, um grupo metoxi-carbonila, um grupo etoxicarbonila, um grupo ciano e um grupo furila;

(32) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (25), em que I é 1 e R é um grupo representado por OR^3 ;

(33) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (32), em que R^3 é um grupo C1-3 alquila que é opcionalmente substituído com um grupo amino;

(34) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (25), em que I é 1 e R é um grupo representado por $S(O)_mR^4$;

(35) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (34), em que R^4 é um grupo C1-3 alquila que é opcionalmente substituído com um grupo amino ou um grupo hidroxila, e m é 0;

(36) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (25), em que I é 1 e R é um átomo de halogênio;

(37) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (36), em que o átomo de halogênio é um átomo de cloro;

(38) o regulador de crescimento da planta de acordo com qualquer um do anterior (25) a (37), em que n é de 1 a 2 e X é um grupo C1-3 alquila, um grupo C1-3 alcóxi, um grupo C1-3 haloalquila, um grupo ciano, um átomo de halogênio ou um grupo nitro;

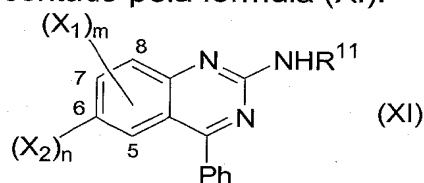
(39) o regulador de crescimento da planta de acordo com o anterior (38), em que X é um átomo de cloro, um átomo de bromo ou um grupo nitro, e X está

na posição 6 e/ou na posição 8;

(40) o regulador de crescimento da planta de acordo com qualquer um do anterior (25) a (37), em que Ar é um grupo fenila que é opcionalmente substituído com (a) átomo(s) de halogênio ou (a) grupo(s) C1-3 alquila;

- 5 (41) um método de regulamento de crescimento da planta compreendendo aplicar uma quantidade eficaz do regulador de crescimento da planta de acordo com qualquer um do anterior (25) a (40) a uma planta ou um hábitat da planta;

(42) um composto representado pela fórmula (XI):



- 10 em que Ph representa um grupo fenila, R^{11} representa um átomo de hidrogênio, um grupo formila, um grupo C1-6 alquila, um grupo C3-6 alquenila ou um grupo C3-6 alquinila em que o grupo alquila, o grupo alquenila e o grupo alquinila são opcionalmente substituídos com pelo menos um substituinte selecionado a partir de um grupo hidroxila, um grupo C1-3 alcóxi, um grupo
- 15 C1-3 alcoxycarbonila, um grupo ciano, um grupo 2-furila e um grupo 2-tetra-hidrofurila,

m representa um número inteiro de 0 a 3,

n representa um número inteiro de 0 a 1,

pelo menos um dentre m e n não é 0,

- 20 X_1 e X_2 são os mesmos ou diferentes e representam um átomo de cloro, um átomo de bromo, um grupo trifluorometila, um grupo ciano ou um grupo nitro, quando m for 2 ou mais, cada X_1 é o mesmo ou diferente um do outro; con-
- tanto que

a) quando m for 1, X_1 é um átomo de 5-cloro ou um átomo de 7-cloro e R^{11}

- 25 representa um grupo metila, n representa um número inteiro de 1, ou

b) quando n for 1 e qualquer uma das condições (1) a (3) está satisfeita, m representa um número inteiro de 1 a 3:

(1) X_2 é um átomo de cloro, e R^{11} é um grupo selecionado a partir de um átomo de hidrogênio, um grupo metila, um grupo 2-hidroxietila, um grupo 3-

- hidroxipropila, um grupo 2,2-dimetoxietila e um grupo cianometila,
- (2) X_2 é um átomo de bromo, e R^{11} é um grupo selecionado a partir de um grupo 2-hidroxietila, um grupo 3-hidroxipropila e um grupo 2-metoxietila, e
- (3) X_2 é um grupo nitro, e R^{11} é um grupo 3-hidroxipropila; ou um sal agricolamente aceitável do mesmo;
- (43) o composto de acordo com o anterior (42), em que R^{11} representa um átomo de hidrogênio, um grupo formila, um grupo metila, um grupo etila, um grupo 2-hidroxietila, um grupo 2-metoxietila, um grupo furfurila, um grupo metoxycarbonilmetila ou um grupo etoxycarbonilametila, m é 0, n é 1, e X_2 é um átomo de cloro ou um grupo nitro, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo;
- (44) o composto de acordo com o anterior (42), em que R^{11} representa um átomo de hidrogênio, um grupo formila, um grupo metila, um grupo etila, um grupo 2-hidroxietila, um grupo 3-hidroxipropila, um grupo 2-metoxietila, um grupo furfurila, um grupo metoxycarbonilmetila ou um grupo etoxycarbonilametila, m é 1, n é 1, X_1 é um átomo de 8-cloro, e X_2 representa um átomo de cloro ou um grupo nitro, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo;
- (45) o composto de acordo com o anterior (42), em que m é um número inteiro de 1 a 3 e n é 0, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo;
- (46) o composto de acordo com o anterior (42), em que R^{11} representa um grupo formila, um grupo C4-6 alquila, um grupo C3-6 alquenila ou um grupo C3-6 alquinila em que o grupo alquila, grupo alquenila e grupo alquinila são opcionalmente substituídos com (a) grupo(s) hidroxila ou (a) grupo(s) C1-3 alcóxi, ou R^{11} representa um grupo C1-3 alcóxicarbonilmetila, um grupo C1-3 alcóxi C1-3 alquila ou um grupo furfurila,
- m é 0,
- n é 1, e
- X_2 é um átomo de cloro, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo;
- (47) o composto de acordo com o anterior (42), em que n é 1, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo;
- (48) o composto de acordo com o anterior (42), em que m é 1 a 3 e n é 1, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo;

(49) o composto de acordo com o anterior (42), (45), (47) ou (48), em que R^{11} é que um grupo C1-3 alcóxicarbonilmetila ou um grupo furfurila, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo; e

(50) o composto de acordo com o anterior (42), em que n é 1 e X_2 é um grupo trifluorometila ou um grupo ciano; e similares.

Breve Descrição de Desenhos

Figura 1 mostra resultados de um teste de resposta de dose utilizando uma substância química capaz de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula no Exemplo 8.

Nas figuras, linhas de dados representam curvas de inibição de crescimento de resposta de dose, em que o eixo X representa a concentração de uma substância química testada e o eixo Y representa uma taxa de crescimento relativa. As figuras esquerdas (três subfiguras de uma fileira vertical esquerda) mostram resultados em sistemas de teste utilizando a célula transformada TM182-CRE1. As figuras direitas (três subfiguras de de uma fileira vertical direita) mostram resultados em sistemas de teste utilizando a célula transformada TM182-p415CYC1. As figuras superiores, as figuras medianas, e as figuras inferiores representam resultados em sistemas de teste utilizando a substância química Ic7-1, a substância química Ic3-1, e a substância química Ic3-3, respectivamente.

Figura 2 mostra resultados de avaliação da atividade de promoção de crescimento de raiz de uma substância de inibição de sinalização de citocinina utilizando alface no Exemplo 10. Na figura, uma linha de dados representa uma curva de promoção de crescimento de resposta de dose em que o eixo X representa a concentração de uma substância química testada (substância química Ic3-1) e o eixo Y representa uma taxa de crescimento de raiz (%).

Figura 3 mostra resultados de avaliação da atividade de promoção de crescimento de raiz de uma substância de inibição de sinalização de citocinina utilizando alface no Exemplo 10. Na figura, uma linha de dados representa uma curva de promoção de crescimento de resposta de dose em que o eixo X representa a concentração de uma substância química testada

(substância química Ic7-1) e o eixo Y representa uma taxa de crescimento de raiz (%).

Figura 4 mostra resultados de avaliação da atividade de promoção de crescimento de raiz de uma substância de inibição de sinalização de citocinina utilizando arroz no Exemplo 11. Na figura, uma linha de dados representa uma curva de promoção de crescimento de resposta de dose em que o eixo X representa a concentração de uma substância química testada (substância química Ic3-1) e o eixo Y representa uma taxa de crescimento de raiz (%).

Figura 5 mostrou resultados de avaliação da atividade de promoção de crescimento de raiz de uma substância de inibição de sinalização de citocinina utilizando arroz no Exemplo 11. Na figura, uma linha de dados representa uma curva de promoção de crescimento de resposta de dose em que o eixo X representa a concentração de uma substância química testada (substância química Ic7-1) e o eixo Y representa uma taxa de crescimento de raiz (%).

Figura 6 mostra resultados de avaliação da atividade de promoção de crescimento de raiz de uma substância de inibição de sinalização de citocinina por tratamento de semente de arroz no Exemplo 12. Na figura, "UTC" representa um resultado de um teste de controle em que apenas acetona foi usada no tratamento de semente. "IAA" representa um resultado de um teste em que um composto de auxina IAA foi usado.

Figura 7 mostra resultados de medida da atividade de formação de raiz adventícia de uma substância de inibição de sinalização de citocinina utilizando hipocótilo de *A. taliana* para avaliar a atividade de promoção de diferenciação da planta no Exemplo 13. Na figura, "seção de controle" mostra um resultado em um teste de controle utilizando um meio de ágar como descrito no Exemplo 13.

Figura 8 mostra resultados de medida da atividade de promoção de crescimento de raiz de uma substância de inibição de sinalização de citocinina utilizando arroz no Exemplo 14. Na figura, "UTC" mostra um resultado de um teste de controle utilizando apenas acetona em tratamento de solo-

encharcado.

Figura 9 mostra resultados de análise da atividade de promoção de crescimento de raiz de uma substância de inibição de sinalização de citocinina utilizando arroz utilizando-se um mecanismo de análise de imagem para medir o comprimento da raiz no Exemplo 14. Relativo a linhas de dados na figura, o eixo X representa a concentração de uma substância química testada (substância química Ic3-3) e o eixo Y representa a soma total (comprimento da raiz total) dos comprimentos da raiz de cada um dos diâmetros da raiz. Na figura, "UTC" mostra um resultado de um teste de controle utilizando apenas acetona tratamento de solo-encharcado. O valor de legenda (L) representa um diâmetro da raiz (mm).

Figura 10 mostra resultados de um teste de inibição da ligação de citocinina a um receptor de citocinina por uma substância teste no Exemplo 19. Na figura, "Apenas DMSO" representa um controle em que uma substância teste não foi adicionada e apenas DMSO, que foi usado como um solvente para uma substância teste, foi adicionado em vez de uma solução de DMSO de uma substância teste. "t-zeatina" representa adição de trans-zeatina como uma substância teste, "Ic3-4" representa adição de Ic3-4 como uma substância teste, e "ABA" representa adição de ácido abscísico como uma substância teste. A concentração do rótulo radioativo 2IP é 10 nM, e a concentração de cada substância teste é 10 μ M.

Figura 11 mostra resultados de avaliação da atividade de promoção de cultivo de arroz de uma substância de inibição de sinalização de citocinina em um sistema de teste em que sementes tratadas com a substância teste foram cultivadas por semeadura seca direta no Exemplo 21. Na figura, "Ic3-3" mostra o número de agricultores por planta no caso de utilizar uma solução de suspensão Absoluta da substância teste Ic3-3 para o tratamento de semente, e "tratamento de suspensão Absoluta" mostra o número de agricultores por planta no caso de utilizar uma solução de suspensão Absoluta para o tratamento de semente em vez da solução de Ic3-3.

Modo para Realizar a Invenção

Na presente invenção, o termo "planta" é usado em um amplo

sentido que indica organismos de forma estacionária vivos através de raízes, tal como grama e árvores, e da mesma forma tem um conceito incluindo um corpo da planta, um tecido da planta, uma célula da planta e similares. Especificamente, o termo "planta" significa organismos tal como plantas mais altas em que um órgão referido como uma raiz pode desempenhar papéis importantes tal como fixação de uma planta no solo, e absorção de água e nutrientes do exterior, e exemplos dos mesmos incluem plantas ornamentais tais como plantas de florescimento e plantas de folhagem ornamentais, colheitas tais como colheitas de grão, vegetais e árvore frutífera, plantas de fibra, árvores, e gramas. Exemplos específicos dos mesmos incluem cereais tais como arroz e milho; gramas tais como grama de capim-panasco e *Zoyisia matrella*; plantas cucurbitáceas tais como tomate, pimentão verde, pimenta vermelha e melancia; plantas cucurbitáceas tais como pepino, abóbora, melão e melancia; verdes tais como repolho, brócolos e repolho chinês; verdes frescos tais como aipo, salsa e alface; vegetais de condimento; *Alliums* tais como alho-poró, cebola e alho; feijões tais como feijão-soja, feijão roxo, ervilha e feijão azúqui; vegetais de fruta tal como morango; raízes axiais tais como rabanete japonês, nabo japonês, cenoura e bardana; batatas tais como taro, batata, batata-doce e inhame; verdes macios tais como aspargos, espinafre e "*honestwort*"; pétalas tais como *Eustoma russellianum*, talo, cravo e crisântemo; colheitas de óleo tais como semente de colza e amendoim; colheitas de açúcar tais como cana-de-açúcar e beterraba de açúcar; colheitas de fibra tais como algodão e junco; colheitas de alimentos tal como trevo e sorgo; árvores frutíferas decíduas tais como maçã, pêra, uva, pêssigo e castanha; árvores cítricas tais como mandarina, limão e toranja; e plantas lenhosas tais como azaleia, rododentro e cedro.

Na presente invenção, o termo "crescimento" de uma planta significa um processo geral em que já existindo órgãos vegetativos (raízes, caules, folhas) são recentemente produzidos e empilhados durante um processo do desenvolvimento precoce de uma planta que começa a germinação de semente ao crescimento e desenvolvimento de raízes, caules e folhas, a formação de flores e em seguida a maturação de sementes. Exemplos do

crescimento incluem germinação, crescimento de raízes, extensão de brotos, extensão de caules, formação e extensão de brotos terminais e brotos axilares, desenvolvimento de ramificações e folhas, formação de brotos de flor, floração, fixação de semente, e maturação de sementes.

5 Na presente invenção, o termo "diferenciação" de uma planta significa que um tecido da planta tal como uma raiz, um caule ou uma folha é formada a partir de um calo que é uma população de célula da planta adquirindo totipotência (rediferenciação), ou significa que um calo é formado a partir de uma célula de um tecido da planta tal como uma raiz, um caule ou
10 uma folha (dediferenciação).

Na presente invenção, o "controle do crescimento de um broto" significa promoção ou controle do crescimento de um broto terminal ou um broto axilar, e exemplos dos mesmos incluem iniciação do crescimento de broto axilar que é suprimido por domínio apical, supressão do crescimento
15 de broto axilar que é iniciado removendo-se um broto terminal, e supressão de crescimento de broto terminal habitual.

Na presente invenção, o "agente capaz de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta" é um agente que pode controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta tratando-se a planta com o a-
20 gente por vários métodos. Controle do crescimento ou diferenciação de uma planta é aplicável para controlar do crescimento ou desenvolvimento de uma planta útil tal como uma colheita de fazenda, que torna possível aumentar crescimento precoce, realçar qualidade, aumentar um rendimento, estabilizar um rendimento sob condições desfavoráveis, e exceto trabalho na produção.
25 Desse modo, o "agente capaz de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta" pode ser usado como um "regulador de crescimento da planta".

Na presente invenção, a "raiz" de uma planta inclui uma raiz principal que desenvolve a partir de uma radícula existindo em um embrião
30 de uma semente, e uma raiz lateral que estende a partir de uma raiz principal através de ramificação, no caso de dicotiledôneas e gimnospermas. No caso de monocotiledoneas, a "raiz" inclui uma radícula (raiz seminal) existin-

do em um embrião de uma semente, uma raiz coroa (denominada raiz fibrosa) que é formada na porção superior depois da terminação do crescimento de uma raiz seminal, e uma raiz lateral prolongando-se de uma raiz adventícia através de ramificação. Da mesma forma, a "raiz" ocasionalmente significa

5 ca cabelo de raiz prolongando continuamente para o exterior que é formado de células epidérmicas de uma raiz. A raiz de uma planta é um órgão que desempenha papéis importantes a uma planta, tal como, fixação de uma planta no solo, e absorção de água e nutrientes do exterior. A raiz de uma planta é da mesma forma muito importante como um lugar onde hormônio

10 da planta é produzido. De um ponto de vista agrícola, muitas colheitas propagam através de suas sementes. Portanto, é um elemento muito importante que leva a qualidade alta e rendimento alto em que o estabelecimento de resistência uniforme é atingido em estágio precoce do crescimento de uma planta. Promoção do crescimento de uma raiz de uma planta é esperado ter

15 vários méritos tais como melhoria em uma taxa da raiz retirada no solo, melhoria na produtividade ou qualidade para melhoria no estabelecimento de resistência ou similares, controle de erva daninha em um estágio precoce para melhoria no estabelecimento de resistência, e melhoria em eficiência de uma fonte de semente. Promoção de dispersão de raiz é esperado levar a

20 um aumento em resistência ao estresse da corrente de ar ou resistência de peste, e uma diminuição na quantidade de fertilizante para melhoria na capacidade de absorção nutriente.

Na presente invenção, o "crescimento de uma raiz" de uma planta significa que o comprimento de uma raiz e o número de raízes aumenta

25 ou que a quantidade, espessura e atividade de uma raiz aumenta, como resultado de divisão, crescimento e um aumento no peso de células de raiz.

Na presente invenção, a "promoção do crescimento de uma raiz" de uma planta significa que o crescimento de uma raiz de uma planta é mais ativado do que habitual, e desse modo o comprimento de uma raiz e o número de raízes aumenta, ou a quantidade, espessura e atividade de uma

30 raiz aumenta quando comparada com o caso de nenhum tratamento.

Na presente invenção, o "agente capaz de promover o cresci-

mento de uma raiz de uma planta" é um agente que pode promover o crescimento de uma raiz de uma planta tratando-se a planta com a substância por vários métodos. Promoção do crescimento de uma raiz de uma planta é aplicável para controle do crescimento ou desenvolvimento de uma planta útil tal como uma colheita de fazenda, que torna possível realçar crescimento precoce, realçar qualidade, aumentar um rendimento, estabilizar um rendimento ainda sob condições desfavoráveis, e exceto trabalho na produção. Desse modo, o "agente capaz de promover o crescimento de uma raiz de uma planta" pode ser usado como um "regulador de crescimento da planta".

Quando aqui usado, o termo "estabelecimento de resistência" significa que uma semente semeada germina e em seguida coleta a raiz no solo em um estado capaz de normalmente crescer como um corpo da planta, ou que uma muda transplantada de uma planta coleta raiz no solo e em seguida normalmente cresce. Promoção de estabelecimento de resistência leva a melhoria no crescimento precoce de uma planta, e desse modo é possível cultivar uma planta saudável. Além disso, como resultado de um aumento no número da plantas cultivadas saudáveis, um aumento no rendimento final é esperado. Por exemplo, no caso de semeadura direta de arroz, é geralmente difícil de sempre garantir um determinado número de mudas estabelecidas por causa de germinação instável e estabelecimento de resistência. O agente capaz de promover estabelecimento de resistência da presente invenção pode promover estabelecimento de resistência para melhorar eficiência em semeadura direta de arroz. O termo "taxa de estabelecimento de resistência" significa a proporção da plantas estabelecidas no número total de sementes semeadas ou o número total de mudas transplantadas de uma planta. No caso de arroz, quando usado aqui, o "estabelecimento de resistência" pode ser definido pela seguinte equação.

$$[\text{taxa de estabelecimento de resistência (\%)}] = [\text{Número de mudas cujo ápice de folha aparece na superfície da água}] / [\text{Número de sementes semeadas}] \times 100$$

O termo "cultivo" de uma planta significa a ramificação durante o crescimento da planta, ou ramos que surgem como um resultado da agricul-

tura. No caso das plantas gramíneas, por exemplo, o termo "cultivo" significa ramos laterais. Promoção de agricultura inclui agricultura precoce e um aumento no número de agricultores. Por exemplo, quando o regulador de crescimento da planta da presente invenção é usado para uma planta sob condições de estresse tal como baixa temperatura, alta temperatura e corrente de ar para tornar o cultivo da planta precoce e desse modo mudas saudáveis podem ser garantidas precocemente, é possível evitar dano de mudas por estresse. Por exemplo, cultivo precoce resulta em um período de cultivo mais curto de uma planta. Visto que a formação de agricultores de uma planta diretamente influencia o número de espigas, um aumento de rendimento pode ser esperado dependendo das condições de cultivo.

Uma substância ativa de auxina pode exibir propriedades desfavoráveis tais como epinastia de folhas, torção de caule, rachadura do caule, e indução de nós de raiz, dependendo do tipo de uma planta, da concentração de tratamento de auxina e similares.

Acredita-se que substâncias ativas de citocinina têm ambas as propriedades de suprimir e promover o crescimento de uma raiz de uma planta [por exemplo, PNAS 101 (23): 8821-8826 (2004)]. Entretanto, para utilizar tais propriedades na prática agrícola, muitos resultados devem ser acumulados. Visto que é normalmente difícil ajustar a quantidade de citocinina em um corpo da planta (particularmente, reduzir a quantidade de citocinina endógena), não é fácil nem sequer para uma pessoa versada na técnica especificamente investigar papéis de citocinina em uma planta.

Acredita-se que citocinina intrínseca de uma planta pode ser negativamente controlada inibindo-se a transdução de sinalização de citocinina para debilitar a sensibilidade à citocinina. Por exemplo, a transdução de sinal de citocinina pode ser inibida mutando-se um receptor de citocinina propriamente dito, e mutantes de receptores de citocinina foram isolados [The Plant Cell 16:1365-1377 (2004), PNAS 101 (23):8821-8826 (2004)]. Entretanto, usando os mutantes, é difícil de controlar o grau de inibição por estágios. Um único mutante de um receptor de citocinina exibe o mesmo fenótipo como aquele do tipo selvagem. Por outro lado, um mutante triplo de um receptor

de citocinina exibe inibição de alongamento de raiz e defeito de crescimento de um corpo da planta.

O "receptor de citocinina derivado da planta de uma célula" na presente invenção significa um receptor de citocinina existindo em uma planta. O receptor de citocinina é uma proteína que especificamente liga-se a citocinina tal como citocinina de purina tal como cinetina ou zeatina ou citocinina de ureia tal como N-fenil-N'-(4-piridil)ureia para controlar a proliferação e diferenciação de células da planta mais altas através do mecanismo de sinalização intracelular denominando um sistema regulador de Dois componentes (ou sistema His to Asp phosphorelay). O receptor de citocinina usado na presente invenção é uma proteína que pertence à família de histidina cinase e composto de um domínio extracelular, um domínio de transmembrana, um domínio de histidina cinase (uma região tendo uma atividade de histidina cinase em células e mantendo os resíduos para ser um sítio ativo) e um domínio de receptor (uma região tendo uma parte receptora para transferência de grupo fosfato e mantendo resíduos de Asp para ser um sítio ativo).

O sistema regulador de dois componentes é mecanismo de sinalização intracelular e receptor de informação que é extensamente usado em *eubacteria*, bactérias antigas, fungos e plantas. Neste mecanismo, uma histidina cinase age como um receptor e a histidina cinase tem uma região de entrada para receber um sinal no lado N-terminal e uma região relativa à transferência de grupo fosfato, que é chamada um domínio de transmissor, no lado C-terminal. Quando a região de entrada percebe um sinal, um resíduo de His no domínio de transmissor (o domínio de histidina cinase descrito acima de um receptor de citocinina) é autofosforilado. O grupo fosfato transfere com fosforilação alternadamente os resíduos de Asp e His específicos conservados, e finalmente fosforila um resíduo de Asp em um domínio de receptor de uma proteína chamada de um regulador de resposta. O grupo fosfato pode ser transferido diretamente a partir da histidina cinase ao regulador de resposta ou pode ser transferido ao regulador de resposta através de alguns estágios de transferência de grupo fosfato. Um sistema regulador de Dois-componentes simples como o último principalmente está presente

em procariotas. Por outro lado, uma transferência de fosfato de multietapa é principalmente vista em eucariotas, e um domínio de receptor frequentemente liga-se à histidina cinase de tais eucariotas. Um mediador de transferência de grupo fosfato está da mesma forma envolvido em transferência de grupo fosfato. A fosforilação do regulador de resposta controla a atividade de uma região de saída que liga-se ao regulador de resposta. A região de saída é frequentemente um regulador transcricional.

No caso de um receptor de citocinina de uma planta, um domínio de receptor está presente na mesma molécula. Em outras palavras, no caso de um receptor de citocinina ligando-se a citocinina, é conhecido que autofosforilação de um resíduo de His na molécula é seguido por transferência de grupo fosfato do resíduo de His a um resíduo de Asp na molécula. Em seguida, é constatado que o grupo fosfato transfere a um resíduo de Asp do regulador de resposta por meio de um resíduo de His do mediador de transferência de fosfato. Por exemplo, no caso de *Arabidopsis thaliana*, é constatado que um grupo fosfato transfere-se do receptor de citocinina CRE1, AHK2 ou AHK3 ao regulador de resposta pelo mediador de grupo fosfato AHP.

Exemplos de um gene que codifica um receptor de citocinina que foi conhecido antes incluem agora sequência de nucleotídeo de genes derivados a partir de *Arabidopsis thaliana* (CRE1: N^o de acesso AB049934, AHK2: N^o de acesso AB046869, AHK3: N^o de acesso AB046870), *Catharanthus roseus* (No. de acesso AY092025), *Oryza sativa* (N^o de acesso AY572461), e *Zea mays* (ZmHK1: N^o de acesso AB042270, ZmHK2: N^o de acesso AB102956, ZmHK3a: N^o de acesso AB102957, ZmHK3b: N^o de acesso AB121445). Um tal gene cuja sequência de nucleotídeo é conhecida pode ser ampliado por PCR utilizando o genoma DNA ou cDNA de um organismo tendo o gene desejado como um padrão e iniciadores que são produzidos na base de uma sequência de nucleotídeo que corresponde às imediações do terminal amino de uma proteína codificada pelo gene e uma sequência de nucleotídeo que corresponde às imediações do terminal carboxila do mesmo, e em seguida isolados. Um gene codificando um receptor de

citocinina pode da mesma forma se obtido a partir da plantas diferentes das plantas descritas acima. Primeiro, mRNA é preparado a partir da planta desejada, e cDNA é sintetizado utilizando-se o mRNA como um modelo e uma transcriptase reversa. O cDNA é incorporado em um vetor de fago tal como ZAPII ou um vetor de plasmídeo tal como pUC para produzir uma biblioteca de cDNA. Em seguida, PCR é realizada utilizando a biblioteca de cDNA como um modelo e iniciadores que são designados e sintetizados na base de sequências de nucleotídeo bem conservadas entre os genes cujas sequências de nucleotídeo são conhecidas como descrito acima, e desse modo um fragmento de DNA contendo pelo menos uma parte de um gene que codifica um receptor de citocinina pode ser ampliado. Em seguida, a biblioteca de cDNA é avaliada utilizando o fragmento de DNA como uma sonda para selecionar um clone positivo. O DNA do clone selecionado é sequenciado, e pode ser confirmado que o gene codifica o receptor de citocinina desejado.

Todos três tipos de receptores de citocinina (CRE1, AHK2, AHK3) de *Arabidopsis thaliana* são histidina cinases para as quais o domínio de receptor liga-se na mesma molécula. Homologia de sequência de aminoácido é alta entre estes três receptores de citocinina, e particularmente, há homologia de sequência de aminoácido alta entre seus domínios extracelulares que acredita-se ligar a citocinina. Da mesma forma, no caso de levedura recombinante como descrito em seguida, todos os três tipos de receptores de citocinina iniciaram sinalização intracelular com respeito a citocinina, e poderia ser confirmado ter a atividade de um receptor de citocinina. Receptores de citocinina das outras plantas são da mesma forma histidina cinases, e suas sequências de aminoácido têm homologia alta com as sequências de aminoácido dos receptores de citocinina de *Arabidopsis thaliana*.

Tabela 1 mostra identidade de sequência de aminoácido de outros receptores de citocinina com o receptor de citocinina CRE1 de *Arabidopsis thaliana*.

Um exemplo preferível do "receptor de citocinina derivado da planta de uma célula" inclui uma proteína que consiste em uma sequência de aminoácido tendo uma identidade de sequência de 45% ou mais, preferi-

velmente 49% ou mais, mais preferivelmente 53% ou mais com a sequência de aminoácido do receptor de citocinina CRE1 de *Arabidopsis thaliana* e tem uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina.

Tabela 1

	Identidade de sequência de aminoácido (%) com CRE1
A. Thaliana AHK2	53%
A. Thaliana AHK3	54%
Catharanthus roseus	52%
Oryza Sativa	49%
Zea mays ZmHK1	57%
Zea mays ZmHK2	51%
Zea mays ZmHK3a	52%
Zea mays ZmHK3b	49%

- 5 A "sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula" é a transdução de sinal descrita acima que é atin-
- gida por transferência de grupo fosfato a partir de autofosforilação de um receptor de citocinina ligando-se a citocinina. Em uma célula da planta, um sinal de resposta de citocinina é transmitido por autofosforilação de um re-
- 10 ceptor de citocinina induzido por ligação de citocinina, transfere a partir de um grupo fosfato do receptor de citocinina autofosforilado a um mediador de transferência de grupo fosfato, e em seguida transferência do grupo fosfato do mediador de transferência de grupo fosfato a um regulador de resposta. Semelhantemente, em uma célula recombinante tendo um receptor de cito-
- 15 cinina derivado da planta, sinalização intracelular do receptor de citocinina é alcançado por transferência de um grupo fosfato. Entretanto, neste caso, um mediador de transferência de grupo fosfato e um regulador de resposta podem ser derivados a partir de uma célula hospedeira. Todos eles podem ser derivados a partir de uma célula hospedeira ou alguns deles podem ser deri-
- 20 vados a partir de uma célula hospedeira. Além disso, um mediador de transferência de grupo fosfato pode não existir. Por exemplo, em uma levedura de brotamento recombinante tendo um receptor de citocinina derivado da plan-

ta, sinalização intracelular do receptor de citocinina é alcançada por transferência de um grupo fosfato do receptor de citocinina autofosforilado por ligação de citocinina ao regulador de resposta Ssk1, que é um regulador de resposta derivado da célula de levedura de brotamento hospedeira, pelo mediador de transferência de grupo fosfato Ypd1, que é um mediador de transferência de grupo fosfato derivado da célula de levedura de brotamento hospedeira. Em uma levedura de divisão recombinante tendo um receptor de citocinina derivado da planta, sinalização intracelular do receptor de citocinina é alcançada por transferência de um grupo fosfato ao regulador de resposta Mcs4 derivado da levedura de divisão hospedeira, pelo mediador de transferência de grupo fosfato Spi1 derivado da levedura de divisão hospedeira. Em uma *Escherichia coli* recombinante tendo um receptor de citocinina derivado da planta, a sinalização intracelular do receptor de citocinina é alcançada por transferência de um grupo fosfato ao regulador de resposta RcsB derivado de *Escherichia coli* hospedeira pelo mediador de transferência de grupo fosfato YojN derivado de *Escherichia coli* hospedeira.

Um exemplo de um método para determinar a presença ou ausência da quantidade de tal sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta inclui um método que compreende determinar a presença ou ausência ou da quantidade de expressão de um gene alvo cuja transcrição é controlada por um regulador de resposta localizado a jusante da sinalização intracelular do receptor de citocinina derivado da planta. Este método inclui um método compreendendo diretamente determinar a presença ou ausência ou a quantidade de expressão do gene alvo, bem como um método compreendendo transformar uma célula hospedeira com um plasmídeo repórter em que um gene repórter tal como um gene de uma proteína fluorescente ou um gene de β -galactosidase é ligado a uma região de promotor do gene alvo, e em seguida determinar a presença ou ausência ou a quantidade de expressão do gene repórter utilizando-se fluorescência ou desenvolveu cor como um indicador, e um método compreendendo medir ou observar um aumento ou diminuição do número de células relativo a expressão do gene alvo, uma mudança nos caracteres da célula, ou similar. Por e-

xemplo, no caso da levedura de brotamento recombinante descrita acima, o crescimento da levedura de brotamento recombinante dependente de citocinina pode ser usado como um indicador para determinar a presença ou ausência ou a quantidade da sinalização intracelular do receptor de citocinina derivado da planta. No caso da levedura de divisão recombinante, o tamanho da levedura de divisão recombinante dependente de citocinina pode ser usado como um indicador para determinar a presença ou ausência ou a quantidade de sinalização intracelular do receptor de citocinina derivado da planta. No caso da *Escherichia coli* recombinante, cor desenvolveu devido a expressão de um gene β -galactosidase que é ligado a uma região de promotor do gene alvo cps pode ser usado como um indicador para determinar a presença ou ausência ou a quantidade de sinalização intracelular do receptor de citocinina derivado da planta. No caso de *Arabidopsis thaliana* transformada com um plasmídeo repórter em que um gene repórter é ligado a uma região de promotor do regulador de resposta tipo-A ARR5 ou ARR6, fluorescência ou cor desenvolvida dependente de citocinina pode ser usado como um indicador para determinar a presença ou ausência ou a quantidade de sinalização intracelular de um receptor de citocinina. Os métodos descritos acima são descritos em, por exemplo, Higuchi e outros, Natureze 409, 1060-1063 (2001); Suzuki e outros, Plant Cell Physiol. 42, 107-113 (2001); Hwang e Sheen, Nature 413, 383-389 (2001), e assim sucessivamente.

Entre vários métodos para determinar sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula como descrito acima, um exemplo preferível como um método mecânico, quantitativo e eficiente é um método que compreende determinar o crescimento da levedura de brotamento recombinante dependente de citocinina medindo-se turvação de um meio líquido com um espectrofotômetro. Um exemplo específico do mesmo inclui o método descrito em JP-UNS 2003-079393.

A "atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula" significa a capacidade para reduzir sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula. Em outras palavras, isto significa a capacidade para reduzir a

quantidade de transferência de grupo fosfato que é iniciada por autofosforilação de um receptor de citocinina e em um grupo fosfato é transferido do receptor de citocinina em um regulador de resposta. Exemplos específicos da atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula incluem a capacidade para inibir a atividade de histidina cinase de um receptor de citocinina, a capacidade para inibir transferência de grupo fosfato de um receptor de citocinina a um mediador de transferência de grupo fosfato, a capacidade para inibir transferência de grupo fosfato do mediador de transferência de grupo fosfato para um regulador de resposta, e a capacidade para inibir controle de transcrição do regulador de resposta. Mais especificamente, um exemplo da capacidade para inibir a atividade de histidina cinase de um receptor de citocinina inclui a capacidade para inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina por mecanismo em que a presença ou ausência de inibição da sinalização intracelular do receptor de citocinina é determinada dependendo da presença ou ausência de inibição de ligação entre uma substância tendo uma atividade agonística de citocinina e o receptor de citocinina, enquanto resultando na inibição da atividade de histidina cinase do receptor de citocinina. Neste caso, como um exemplo de um método para determinar se uma substância teste atualmente inibe a ligação entre uma substância tendo uma atividade agonística de citocinina e um receptor de citocinina inclui um método compreendendo uso de uma substância radiorrotulada tendo uma atividade agonística de citocinina e um receptor de citocinina. Por exemplo, uma substância tendo uma atividade agonística de citocinina que é rotulada com um radioisótopo de hidrogênio, trítio para se tornar altamente radioativo, e uma proteína de receptor de citocinina preparada a partir de uma levedura recombinante em que um gene de receptor de citocinina é introduzido são permitidos coexistir em um tampão adequado, e em seguida a proteína de receptor de citocinina é coletada em um filtro de vidro para medir a radioatividade. Desse modo, a substância tendo uma atividade agonística de citocinina que é rotulada com trítio para se tornar altamente radioativo e que está ligando ao receptor de citocina pode ser detectada. Quando uma substância

teste é da mesma forma permitida coexistir com a substância radiorrotulada tendo uma atividade agonística de citocinina e a proteína de receptor de citocinina em um tampão, ela pode ser determinada se a substância teste inibir a ligação entre a substância tendo uma atividade agonística de citocinina e o receptor de citocinina utilizando-se uma diminuição no valor de medida de radioatividade como um indicador. Em seguida, quando a substância teste é adicionada ao sistema de reação descrito acima para determinar a presença ou ausência ou a quantidade de sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta, influência da substância teste na sinalização intracelular do receptor de citocinina derivado da planta pode ser investigada.

O "agente que tem uma atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula" significa um agente compreendendo, como o ingrediente ativo, uma substância tendo uma atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula.

Na presente invenção, o "agente capaz de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta que tem uma atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula" significa um agente cuja capacidade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula é determinada pelo método descrito acima e que pode controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta. O agente é desejavelmente um agente em que o agente capaz de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta é um regulador de crescimento da planta.

Na presente invenção, o "regulador de crescimento da planta" é um agente capaz de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta.

Um exemplo de um método para determinar a capacidade de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta inclui um método para determinar uma atividade de promoção de crescimento de raiz em uma planta bem como os métodos descritos na presente invenção. Especificamente, a capacidade de controlar o crescimento ou diferenciação de uma

planta pode ser determinada, por exemplo, de acordo com o seguinte método.

- De acordo com composição descrita abaixo, um meio padrão de Enshi é preparado (vide Tabela 2). Uma solução de uma substância química em DMSO é dispensada em cada 4 µl para agrupar tubos de forma que a concentração final pode ser 0,001 ppm a 10 ppm. Em seguida, 600 µl do meio padrão de Enshi esterilizado é adicionado a cada tubo de grupo, seguido por mistura. Em cada tubo, 10 a 20 sementes de *Arabidopsis thaliana* são postas e cultivadas a 22°C durante 10 dias em um lugar luminoso. Em seguida, o comprimento médio de raízes principais é medido. Uma média de oito repetições é determinada e em seguida uma taxa de crescimento de raiz é determinada pela seguinte equação.

Tabela 2

Composição		Concentração (mg/L)
Nitrato de cálcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	950
Nitrato de potássio	KNO_3	810
Sulfato de magnésio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500
Fosfato de amônio	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	155
Ferro quelado	Fe-EDTA	22,62
Ácido bórico	H_3BO_3	2,86
Sulfato de manganês	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81
Sulfato de zinco	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08
Molibdato de sódio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025
Ajustado em pH 5,8		

- Taxa de crescimento de raiz (%) = (comprimento de raiz principal médio na seção tratada por substância química) / (comprimento de raiz principal médio na seção de controle) × 100

Pode ser dito que uma substância teste exibindo uma taxa de crescimento de raiz significativamente alta tem uma atividade de promoção de crescimento de raiz. Mais preferivelmente, uma substância teste tendo

uma taxa de crescimento de raiz de 120% ou mais pode ser julgada ter uma atividade de promoção de crescimento de raiz.

O regulador de crescimento da planta na presente invenção compreende uma substância química capaz de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula, ou um sal
5 agricolamente aceitável do mesmo como um ingrediente ativo.

Na presente invenção, o "sal agricolamente aceitável" significa um sal na forma que não o torna impossível produzir um regulador de crescimento da planta e aplicar o produto, e pode ser um sal em qualquer forma.
10 Exemplos específicos do sal incluem sais de ácido mineral tal como cloridrato, bromidrato, hidriodeto, sulfato, nitrato e fosfato; sais de ácido orgânico tal como formato, acetato, propionato, oxalato, malonato, succinato, fumarato, maleato, lactato, malato, tartarato, citrato, metanossulfonato e etanossulfonato; sais de adição de ácido, por exemplo, sais de aminoácido ácido tal
15 como aspartato e glutamato; sais de metal tal como sais de metal de álcali (sal de sódio, sal de potássio, etc.), sais de metal alcalino terroso (sal de magnésio, etc.), e sais de alumínio; sais de adição de bases orgânicas tais como metilamina, etilamina e etanolamina e de aminoácidos básicos tais como lisina e ornitina; e sais de amônio.

O regulador de crescimento da planta é normalmente usado na forma de uma formulação tal como um concentrado emulsificável, um pó umectável, uma suspensão ou um pó solúvel em água que é obtenível misturando-se com um veículo sólido, um veículo líquido ou similar e, se necessário, adicionar (a) tensoativo(s) e outros auxiliares de formulação do mesmo.
20 A formulação normalmente contém 0,5 a 90% em peso, preferivelmente 1 a 80% em peso de uma substância capaz de inibir a sinalização citocinina.
25

Exemplos do veículo sólido usados para formulação incluem pós finos e grânulos de argila (caolinita, terra diatomácea, óxido de silício hidroso sintético, argila Fubasami, bentonita, argila de ácido, etc.), talco, outros minerais inorgânicos (sericita, pó de quartzo, pó de enxofre, carbono ativado, carbonato de cálcio, etc.) e fertilizantes químicos (sulfato de amônio, fosfato
30

de amônio, nitrato de amônio, cloreto de amônio, ureia, etc.). Exemplos do veículo líquido incluem água, álcoois (metanol, etanol, etc.), cetonas (acetona, metil etil cetona, ciclohexanona, etc.), hidrocarbonetos aromáticos (tolueno, xileno, etilbenzeno, metilnaftaleno, etc.), hidrocarbonetos não aromáticos (hexano, cicloexano, querosene, etc.), ésteres (acetato de etila, acetato de butila, etc.), nitrilos (acetonitrilo, isobutironitrilo, etc.), éteres (dioxano, éter di-isopropílico, etc.), amidas de ácido (dimetilformamida, dimetilacetamida, etc.) e hidrocarbonetos halogenados (dicloroetano, tricloroetileno, etc.).

Exemplos do tensoativo incluem sulfatos de alquila, sulfonatos de alquila, sulfonatos de alquil arila, éteres de alquil arila e seus compostos de polioxietileno, éteres de polietileno glicol, ésteres de álcool poli-hídricos, e derivado de álcool do açúcar.

Exemplos de outros auxiliares de formulação incluem agentes de aderência e agentes de dispersão tal como caseína, gelatina, polissacarídeos (amido, goma Arábica, derivados de celulose, ácido algínico, etc.), derivados de lignina, bentonita, polímeros solúveis em água sintéticos (álcool polivinílico, polivinil pirrolidona, ácido poliacrílico, etc.), e agentes de estabilização tal como PAP (fosfato de isopropila ácido), BHT (2,6-terc-butil-4-metilfenol), BHA (2-/3-terc-butil-4-metoxifenol), óleos vegetais, óleos minerais, ácidos graxos e ésteres de ácido graxo.

Na presente invenção, o "regulador de crescimento da planta compreendendo uma substância química capaz de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo, como um ingrediente ativo" é um agente que pode controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta contendo-se, como um ingrediente ativo, uma substância química cuja capacidade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula é determinada pelo método descrito acima ou um sal agricolamente aceitável da substância química. A substância química é desejavelmente uma substância química tendo a capacidade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina em um sistema de contato da levedura de brotamento recombinante descrita acima que compreende

um receptor de citocinina e uma substância tendo uma atividade agonística para o receptor de citocinina. Mais desejavelmente, um exemplo da substância química inclui uma substância química tendo a capacidade de inibir a atividade de um receptor de citocinina em um sistema de contato da levedura de brotamento recombinante descrita acima compreendendo um receptor de citocinina e uma substância tendo uma atividade agonística ao receptor de citocinina, de forma que a atividade do receptor de citocinina possa ser reduzida na presença de 0,6 ppm de trans-zeatina e 2 ppm ou mais da substância química quando comparado com o caso na ausência da substância química. Ainda mais desejavelmente, um exemplo da substância química inclui uma substância química tendo a capacidade de inibir a atividade de um receptor de citocinina em um sistema de contato da levedura de brotamento recombinante descrita acima compreendendo um receptor de citocinina e uma substância tendo uma atividade agonística ao receptor de citocinina, de forma que a atividade do receptor de citocinina possa ser reduzida por 90% ou mais na presença de 0,6 ppm de trans-zeatina e 2 ppm ou mais da substância química quando comparado com o caso na ausência da substância química.

Na presente invenção, um "método para testar a capacidade de uma substância teste promover o crescimento de uma raiz de uma planta, que compreende:

- (1) uma primeira etapa de medir uma atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina selecionado a partir do seguinte grupo A (ou a presença ou ausência ou a quantidade de sinalização intracelular) em um sistema de contato compreendendo uma célula tendo o receptor de citocinina, uma substância tendo uma atividade agonística ao receptor de citocinina e a substância teste; e
- (2) uma segunda etapa de avaliar a capacidade da substância teste promover o crescimento de uma raiz de uma planta na base de uma diferença obtida comparando-se a atividade medida na primeira etapa com a atividade em controle" é um método compreendendo a primeira etapa e a segunda etapa entre vários métodos para testar a capacidade de promover o cresci-

mento de uma raiz de uma planta de uma substância teste.

O "Grupo A" representa como segue:

- (a) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID NO:1,
- (b) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido SEQ ID
- 5 NO:1 em que um ou mais aminoácidos são deletados, adicionados ou substitu-
tuídos, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de citocinina,
- (c) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido tendo uma
identidade de sequência de 45% ou mais com a sequência de aminoácido
SEQ ID NO:1, e tendo uma atividade de funcionar como um receptor de cito-
- 10 cinina
- (d) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada
pela sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2
- (e) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada
por um polinucleotídeo que hibridiza sob uma condição estrita com um poli-
- 15 nucleotídeo complementar a um polinucleotídeo tendo a sequência de nu-
cleotídeo de SEQ ID NO:2, e tendo uma atividade de funcionar como um
receptor de citocinina.

A primeira etapa é uma etapa de medir uma atividade de inibir a
sinalização intracelular do receptor de citocinina (ou a presença ou ausência
20 ou a quantidade da sinalização intracelular) em um sistema de contato com-
preendendo uma célula tendo os vários receptores de citocinina descritos
acima, uma substância tendo uma atividade agonística ao receptor de citoci-
nina e a substância teste. A segunda etapa é uma etapa de avaliar a capaci-
dade da substância teste promover o crescimento de uma raiz de uma planta
25 na base de uma diferença obtida comparando-se a atividade medida na pri-
meira etapa com a atividade em controle. Quando aqui usado, por exemplo
no caso onde uma solução de uma substância teste em um solvente é adi-
cionada a um sistema de reação, o controle significa um teste em que ape-
nas o solvente é adicionado.

30 O receptor de citocinina derivado da planta de uma célula usada
no método para testar a capacidade de uma substância teste promover o
crescimento de uma raiz de uma planta que compreende a primeira etapa e

a segunda etapa é uma proteína mostrada no grupo A descrito acima. Entre as proteínas do grupo A descrito acima, nas sequências de aminoácido de proteínas mostradas em (b), (c), (d) e (e), diferenças da sequência de aminoácido de (a) que podem ser ocasionalmente encontradas são devido a deleção, substituição, adição, e similares de alguns aminoácidos. As diferenças incluem deleção causada por processamento que uma proteína tendo a sequência de aminoácido de (a) sofre em células. Além disso, as diferenças incluem deleção, substituição, adição, e similares de aminoácidos causados por mutação genética de ocorrência natural devido a diferença de espécies, diferença individual ou similar de organismos dos quais a proteína é derivada, ou mutação genética artificialmente introduzida por mutagenese sítio dirigida, mutagenese randomizada, tratamento de mutagenese ou similar.

O número de tal deleção de aminoácido, substituição, adição ou similar pode estar dentro da faixa em que a atividade de histidina cinase de um receptor de citocinina pode ser encontrado. Exemplos da substituição de aminoácido incluem substituições com aminoácidos tendo características análogas tais como hidrofobicidade, carga, pK e estrutura de espaço. Exemplos específicos de tal substituição incluem substituições dentro dos grupos de (1) glicina, alanina; (2) valina, isoleucina, leucina; (3) ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, glutamina; (4) serina, treonina; (5) lisina, arginina; (6) fenilalanina, tirosina; e similares.

Um exemplo de um método para artificialmente realizar tal deleção, adição ou substituição de aminoácido (em seguida, ocasionalmente referido como alternância de aminoácido, em geral) inclui um método que compreende submeter DNA codificando a sequência de aminoácido de (a) a mutagenese sítio-específica e em seguida expressando o DNA por uma técnica convencional. Exemplos do método de mutagenese sítio-específico incluem um método compreendendo uso de mutação ambarina (método dúplex intervalado, *Nucleic Acids Res.*, 12, 9441-9456 (1984)), e um método compreendendo PCR utilizando iniciadores para introduzir mutação. Um exemplo de um método para artificialmente realizar alternância de aminoácido inclui um método que compreende submeter DNA codificando a sequência de amino-

ácido de (a) a mutagênese randomizada e em seguida expressando o DNA por um método convencional. Um exemplo de um método para mutagênese randomizada inclui um método compreendendo PCR utilizando DNA codificando qualquer uma das sequências de aminoácido descritas acima como um modelo e utilizando um par de iniciador pelo qual o comprimento total de DNA pode ser ampliado, em uma condição de reação que a concentração de adição de cada de dATP, dTTP, dGTP e dCTP usados como substratos é mudado a partir da condição habitual ou em uma condição de reação que a concentração de Mg^{2+} para promover a reação de polimerase é aumentada a partir da condição geral. Exemplo de uma tal técnica de PCR inclui um método descrito em Method in Molecular Biology, (31), 1994, 97-112, bem como um método descrito em WO0009682.

Quando aqui usado, a "identidade de sequência" significa identidade entre duas sequências de nucleotídeo ou duas sequências de aminoácido. A "identidade de sequência" é determinada comparando-se duas sequências otimamente alinhadas em todas as suas regiões. O alinhamento ideal das sequências de nucleotídeo ou das sequências de aminoácido pode conter adição ou deleção (por exemplo, abertura). Tal identidade de sequência pode ser calculada realizando análise de homologia utilizando programas tais como FASTA [Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 4, 2444-2448 (1988)], BLAST [Altschul e outros Journal of Molecular Biology, 215, 403-410 (1990)], e CLUSTAL W [Thompson, Higgins&Gibson, Nucleic Acid Research, 22, 4673-4680 (1994a)] para construir alinhamentos. Os programas descrito acima estão geralmente disponíveis na *homepage* (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) de DNA Data Bank of Japan [international DNA data bank operated in Center for Information Biology and DNA data bank of Japan; CIB/DDBJ de Bational Institute of Genetics] ou similar. A identidade de sequência pode da mesma forma ser obtida utilizando-se *software* de análise de sequência comercialmente disponível. Especificamente, por exemplo, análise de homologia é realizada por método de Lipman-Pearson [Lipman, D. J. e Pearson, W.R., Science, 227, 1435-1441, (1985)] e utilizando GENETYX-WIN Ver.5 (fabricado por Software Development Co, Ltd.) pa-

ra construir alinhamentos, e desse modo, identidade de sequência pode ser calculada.

A "condição estrita" descrita em (e) inclui uma tal condição cuja hibridação é realizada a 45°C em uma solução contendo 6 x SSC (10 x SSC contém 1,5M de NaCl e 0,15M de citrato trissódico) seguido por lavagem com 2 x SSC a 50°C (Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6), em hibridação realizada de acordo com um método convencional, por exemplo, como descrito em Molecular Cloning 2ª edição escrita por Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T. emitido por Cold Spring Harbor Laboratory Press. A concentração de sal na etapa de lavagem pode ser selecionada a partir de, por exemplo, a faixa de 2 x SSC (condição estrita baixa) a 0,2 x SSC (condição estrita alta). A temperatura na etapa de lavagem pode ser selecionada a partir de, por exemplo, faixa de temperatura ambiente (condição estrita baixa) a 65°C (condição estrita alta). Igualmente a concentração de sal e a temperatura podem ser mudadas.

Cada uma destas proteínas é uma proteína tendo uma atividade que funciona como um receptor de citocinina. Desejavelmente, a seguinte proteína é usada: uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido em que resíduos de aminoácido que correspondem às posições (I) 459 e (II) 973 de SEQ ID NO: 1 são respectivamente (I) histidina na posição 459 e (II) ácido aspártico na posição 973, quando a sequência de aminoácido da proteína está alinhada com a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 1 de forma que a identidade de sequência máxima possa ser obtida. Quando aqui usado, "a sequência de aminoácido da proteína está alinhado com a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 1 de forma que a identidade de sequência máxima possa ser obtida" significa que a análise de identidade de sequência de aminoácido plural de interesse incluindo a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 1 é realizada utilizando-se o programa descrito acima tal como FASTA, BLAST, ou CLUSTAL W para alinhar as sequências de aminoácido. Como resultado do alinhamento de sequências plurais por um tal método, é possível determinar as posições de resíduos de aminoácido homólogos em cada uma das sequências de aminoácido apesar da inserção

ou deleção que existem nas sequências de aminoácido. As posições homólogas acredita-se que sejam as mesmas posições na estrutura tridimensional, e podem ser calculadas para ter efeitos análogos à função específica da proteína de interesse. Por exemplo, no caso de receptores de citocinina conhecidos incluindo o receptor de citocinina cuja sequência é descrita na presente invenção, resíduos de aminoácido correspondentes às posições (I) 459 e (II) 973 de SEQ ID NO: 1 são respectivamente (I) histidina na posição 459 e (II) ácido aspártico na posição 973, quando a sequência de aminoácido do receptor de citocinina está alinhada com a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 1 de forma que a identidade de sequência máxima possa ser obtida.

O ingrediente ativo do agente capaz de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta pode ser procurado, por exemplo, determinando-se a capacidade para promover o crescimento de uma raiz da planta.

O método para testar a capacidade para promover o crescimento de uma raiz de uma planta que compreende utilizar um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula como descrito acima pode da mesma forma ser usado para procurar uma substância tendo a capacidade de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta. Especificamente, quando a capacidade de uma substância teste para promover o crescimento de uma raiz de uma planta é determinada ser um valor certo ou mais ou um valor certo ou menos utilizando-se o método para testar a capacidade de promover o crescimento de uma raiz de uma planta compreendendo utilizar um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula, a substância é selecionada. Desse modo, uma substância tendo a capacidade para promover o crescimento de uma raiz de uma planta pode ser procurada.

Porque uma substância selecionada pelo método minucioso tem a capacidade de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta, uma composição contendo a substância ou um sal agricolamente aceitável do mesmo como um ingrediente ativo pode ser um regulador de crescimento da planta.

Exemplos específicos da substância capaz de inibir a sinalização

de citocinina incluem os antagonistas de citocinina, e agonistas de citocinina.

A substância de inibição de sinalização de citocinina selecionada pelo método minucioso descrito acima pode promover o crescimento de uma raiz de uma planta. O crescimento de uma raiz inclui alongamento da raiz principal, alongamento de uma raiz lateral, e alongamento de cabelo da raiz.

A atividade de promoção de crescimento de raiz da substância de inibição de sinalização de citocinina selecionada pelo método minucioso descrito acima pode ser testada utilizando-se, por exemplo, o seguinte método. Por exemplo, soluções aquosas, meios de cultura hidropônicos ou meios de cultura de tecido contendo a substância de inibição de sinalização de citocinina em concentrações diferentes dentro da faixa de 0,0001 a 100 ppm são preparados dependendo do tipo de uma planta e um método de ensaio. No caso de um teste de placa Petri, um papel filtro disperso em uma placa Petri é impregnado com a solução, e sementes da planta são postas neste. No caso de um teste de bolsa, um papel pesado é impregnado com a solução, em que o papel pesado é colocado em uma bolsa que permite a observação do crescimento de raiz tal como uma bolsa para crescimento de semente, e as sementes da planta são semeadas nesta. Um meio sólido é preparado adicionando-se agarose, ágar ou similar à solução em uma placa Petri plástica ou um tubo de centrifuga de plástico, e as sementes da planta são semeadas neste. Depois da incubação durante um certo período a 10 a 30°C na luz, os comprimentos da raiz principal e raízes laterais, o número de raízes laterais, o peso úmido da raiz, o peso seco da raiz, e assim sucessivamente são medidos.

A substância de inibição de sinalização de citocinina selecionada pelo método minucioso descrito acima pode ser usada como um regulador de crescimento da planta.

Em grupos representados por R, X, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ e R⁷ no composto representado pela fórmula geral (I) usado na presente invenção (em seguida, às vezes, referido como o composto (I)), exemplos do "grupo hidrocarboneto" incluem um grupo hidrocarboneto alifático, um grupo hidrocarboneto saturado monocíclico e um grupo hidrocarboneto aromático, e um

grupo hidrocarboneto tendo 1 a 16 átomos de carbono é preferido. Exemplos específicos do mesmo incluem um grupo alquila, um grupo alquenila, um grupo alquinila, um grupo cicloalquila, um grupo aralquila e um grupo arila.

5 O "grupo alquila" é preferivelmente, por exemplo, um grupo alquila inferior. Exemplos específicos do grupo alquila incluem grupos C1-6 alquila tal como metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutyla, sec-butyla e terc-butyla, pentila e hexila.

10 O "grupo alquenila" é preferivelmente, por exemplo, um grupo alquenila inferior. Exemplos específicos do grupo alquenila incluem grupo C2-6 alquenila tal como vinila, 1-propenila, alila, isopropenila, butenila e isobutenila.

O "grupo alquinila" é preferivelmente, por exemplo um grupo alquinila inferior. Exemplos específicos do grupo alquinila incluem grupo C2-6 alquinila tal como etinila, propargila e 1-propinila.

15 O "grupo cicloalquila" é preferivelmente, por exemplo um grupo cicloalquila inferior. Exemplos específicos do grupo cicloalquila incluem grupo C3-6 cicloalquila tal como ciclopropila, ciclobutyla, ciclopentila e cicloexila. O "grupo aralquila" é preferivelmente, por exemplo um grupo C7-11 aralquila tal como benzila ou fenetila. Especificamente, por exemplo, um grupo benzila é usado.

O "grupo arila" é preferivelmente um grupo C6-14 arila tal como fenila, 1-naftila, 2-naftila, bifenilila ou 2-antrila. Especificamente, por exemplo, um grupo fenila é usado.

25 Exemplos de um substituinte para o "grupo hidrocarboneto" e o "grupo C1-6 alquila" do "grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído" e o "grupo C1-6 alquila opcionalmente substituído" incluem um átomo de halogênio (por exemplo, flúor, cloro, bromo, iodo, etc.), um grupo nitro, um grupo ciano, um grupo hidroxila, um grupo alquila inferior (por exemplo, um grupo C1-6 alquila tal como metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutyla, sec-butyla, terc-butyla, pentila, isopentila, neopentila, ou hexila, etc.), um grupo alcóxi inferior (por exemplo, um grupo C1-6 alcóxi tal como metóxi, etóxi, propóxi, isopropóxi, butóxi, isobutóxi, pentilóxi ou hexilóxi, etc.), um grupo

amino, um grupo alquilamino mono-inferior (por exemplo, um grupo mono-C1-6 alquilamino tal como metilamino ou etilamino, etc.), um grupo alquilamino di-inferior (por exemplo, um grupo di-C1-6 alquilamino tal como dimetilamino ou dietilamino, etc.), um grupo imino, um grupo carboxila, um grupo alquilcarbonila inferior (por exemplo, um grupo C1-6 alquilcarbonila tal como acetila ou propionila, etc.), um grupo alcóxicarbonila inferior (por exemplo, um grupo C1-6 alcóxicarbonila tal como metóxicarbonila, etóxicarbonila, propóxicarbonila ou butóxicarbonila, etc.), um grupo carbamoila, um grupo de tiocarbamoila, um grupo alquilcarbamoila monoinferior (por exemplo, um grupo mono-C1-6 alquilcarbamoila tal como metilcarbamoila ou etilcarbamoila, etc.), um grupo alquilcarbamoila di-inferior (por exemplo, um grupo di-C1-6 alquilcarbamoila tal como dimetilcarbamoila ou dietilcarbamoila, etc.), um grupo arilcarbamoila (por exemplo, um grupo C6-10 arilcarbamoila tal como fenilcarbamoila ou naftilcarbamoila, etc.), um grupo arila (por exemplo, um grupo C6-10 arila tal como fenila ou naftila, etc.), um grupo arilóxi (por exemplo, um grupo C6-10 arilóxi tal como fenilóxi ou naftilóxi, etc.), um grupo heterocíclico (por exemplo, 2- ou 3-tienila, 2- ou 3-tetra-hidrotienila, 2- ou 3-furila, 2- ou 3-tetra-hidrofurila, 1-, 2- ou 3-pirrolila, 1-, 2- ou 3-pirrolidinila, 2-, 4- ou 5-oxazolila, 3-, 4- ou 5-isoxazolila, 2-, 4- ou 5-tiazolila, 3-, 4- ou 5-isotiazolila, 3-, 4- ou 5-pirazolila, 2-, 3- ou 4-pirazolidinila, 2-, 4- ou 5-imidazolila, 4- ou 5-1H-1,2,3-triazolila, 3- ou 5-1,2,4-triazolila, 5-1H- ou 5-2H-tetrazolila, 2-, 3- ou 4-piridila, 2-, 4- ou 5-pirimidinila, 1-, 2- ou 3-tiomorfolinila, 1-, 2- ou 3-morfolinila, 1-, 2-, 3- ou 4-piperidino, 2-, 3- ou 4-piperidila, 2-, 3- ou 4-tiopiranila, 2-, 3- ou 4-4H-1,4-oxadinila, 2-, 3- ou 4-4H-1,4-tiazinila, 1,3-tiazinila, 1- ou 2-piperazinila, 3-, 5- ou 6-1,2,4-triazinila, 2-1,3,5-triazinila, 3- ou 4-piridazinila, 2-pirazinila, etc.), um grupo alquilcarbonilamino inferior (por exemplo, um grupo C1-6 alquilcarbonilamino tal como acetilamino, etc.), um grupo mercapto, um grupo C1-6 alquiltio (por exemplo, um grupo C1-6 alquiltio tal como metiltio, etc.), um grupo alquilsulfinila (por exemplo, um grupo C1-6 alquilsulfinila tal como metilsulfinila, etc.), um grupo alquilsulfonila (por exemplo, um grupo C1-6 alquilsulfonila tal como metilsulfonila, etc.), um grupo ariltio (por exemplo, um grupo C6-10 ariltio tal como feniltio, etc.), um

grupo de arilsulfinila (por exemplo, um grupo C6-10 arilsulfinila tal como fenilsulfinila, etc.), um grupo arilsulfonila (por exemplo, um grupo C6-10 arilsulfonila tal como fenilsulfonila, etc.), um grupo oxo e um grupo tioxo.

5 O grupo acila (por exemplo, formila, acetila, propionila, pivaloila, acrilóila, benzoila, etc.) é um tipo de um grupo hidrocarboneto substituído com um grupo oxo e é incluído no "grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído" e o "grupo C1-6 alquila opcionalmente substituído".

10 O "grupo hidrocarboneto" e o "grupo C1-6 alquila" do "grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído" e o "grupo C1-6 alquila opcionalmente substituído" pode ter 1 ou mais, preferivelmente 1 a 3 dos substituintes descrito acima nas posições substituíveis. Quando o substituinte é um átomo de halogênio, o grupo hidrocarboneto e o grupo C1-6 alquila podem ter o número máximo substituível de substituintes. Quando eles tiverem 2 ou mais substituintes, os substituintes são os mesmos ou diferentes.

15 Quando o substituinte for um grupo alquila inferior, um grupo alcóxi inferior, um grupo alquilamino monoinferior, um grupo alquilamino di-inferior, um grupo alquilcarbonila inferior, um grupo alcoxicarbonila inferior, um grupo alquilcarbamoila monoinferior, um grupo alquilcarbamoila di-inferior, um grupo arilcarbamoila, um grupo arila, um grupo arilóxi, um grupo
20 heterocíclico, um grupo alquilcarbonilamino inferior, um grupo alquiltio, um grupo alquilsulfinila, um grupo alquilsulfonila, um grupo ariltio, um grupo arilsulfinila, um grupo arilsulfonila ou similar, o substituinte é opcionalmente substituído com 1 a 3 substituintes selecionados a partir do grupo que consiste em um átomo de halogênio (por exemplo, flúor, cloro, bromo, iodo,
25 etc.), um grupo nitro, um grupo ciano, um grupo hidroxila, um grupo C1-4 alcóxi (por exemplo, metóxi, etóxi, propóxi, isopropilóxi, butóxi, isobutilóxi), um grupo arila, um grupo oxo e similares. Quando o substituto for um grupo arilcarbamoila, um grupo arila, um grupo arilóxi, um grupo heterocíclico, um grupo C6-10 ariltio, um grupo C6-10 arilsulfinila, um grupo C6-10 arilsulfonila
30 ou similar, o substituinte é opcionalmente substituído com um a três grupos C1-4 alquila (por exemplo, metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutila, sec-butila, terc-butila, etc.).

Exemplos do "grupo C1-6 alquila" incluem metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutila, sec-butila e terc-butila, pentila, e hexila.

Exemplos do "grupo C1-3 alquila" (incluindo o grupo C1-3 alquila contido em um grupo C1-3 alquilamino e um grupo di C1-3 alquilamino) incluem metila, etila, propila e isopropila.

Exemplos do "grupo C3-6 alquenila" incluem 1-propenila, alila, isopropenila, butenila e isobutenila.

Exemplos do "grupo C3-6 alquinila" incluem propargila e 1-propinila.

Exemplos do "grupo C1-3 alcóxi" (incluindo o grupo C1-3 alquila contido em um grupo hidróxi C1-3 alcóxi e um grupo C1-3 alcóxicarbonila) incluem metóxi, etóxi, propóxi e isopropilóxi.

Exemplos do "grupo C1-3 acila" (incluindo o grupo C1-3 acila contido em um grupo C1-3 aciltio) incluem formila, acetila e propionila.

Exemplos do "grupo C1-3 haloalquila" incluem clorometila, trifluorometila, 2-bromoetila, 2,2,2-trifluoroetila e 2,2,3,3,3-pentafluoropropila.

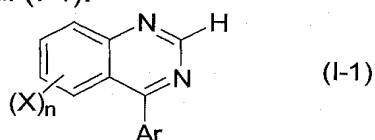
Exemplos do "grupo amino cíclico" do "R¹ e R² são empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados para formar um grupo amino cíclico opcionalmente substituído" incluem 1-aziridinila, pirrolidino, piperidino, morfolino e tiomorfolino. Exemplos de um substituinte para o "grupo amino cíclico" incluem 1 a 3 de substituintes descritos acima tal como um grupo C1-3 alquila, um grupo C1-3 alcóxi e um grupo hidroxila.

Exemplos do "grupo arila" nos grupos representados por Ar incluem grupos arila descritos como exemplos do "grupo hidrocarboneto" representado por R, X, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ e R⁷.

Exemplos do "grupo heteroarila" nos grupos representados por Ar incluem 2- ou 3-tienila, 2- ou 3-furila, 1-, 2- ou 3-pirrolila, 2-, 4- ou 5-oxazolila, 3-, 4- ou 5-isoxazolila, 2-, 4- ou 5-tiazolila, 3-, 4- ou 5-isotiazolila, 3-, 4- ou 5-pirazolila, 2-, 4- ou 5-imidazolila, 4- ou 5-1H-1,2,3-triazolila, 3- ou 5-1,2,4-triazolila, 5-1H- ou 5-2H-tetrazolila, 2-, 3- ou 4-piridila, 2-, 4- ou 5-pirimidinila, 1- ou 2-piperazinila, 3-, 5- ou 6-1,2,4-triazinila, 2-1,3,5-triazinila, 3- ou 4-piridazinila, e 2-pirazinila.

Exemplos de um substituinte para o "grupo arila" e o "grupo heteroarila" incluem grupos descritos como exemplos de um substituinte para o "grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído" e o "grupo C1-6 alquila opcionalmente substituído" representado por R, X, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ e R⁷.

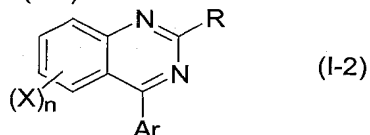
O composto da fórmula geral (I) em que I é 0 é o composto em que a posição 2 do esqueleto de quinazolina é não-substituída, isto é, um composto da fórmula geral (I-1):



em que X representa um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído, um grupo representado por NR¹R², um grupo representado por OR³, um grupo representado por S(O)_mR⁴, um grupo nitro ou um átomo de halogênio, em que R¹ representa um átomo de hidrogênio ou um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído, R² representa um átomo de hidrogênio, um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído, um grupo representado por NR⁵R⁶ (em que R⁵ e R⁶ são os mesmos ou diferentes e representa um átomo de hidrogênio ou um grupo C1-C6 alquila opcionalmente substituído) ou um grupo representado por OR⁷ (em que R⁷ representa um átomo de hidrogênio ou um grupo C1-C6 alquila opcionalmente substituído), ou R¹ e R² são empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados para formar um grupo amino cíclico opcionalmente substituído, R³ e R⁴ cada qual representa um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído, m representa um número inteiro de 0 a 2, n representa um número inteiro de 0 a 4, quando n for 2 ou mais, cada X é o mesmo ou diferente um do outro, e Ar representa um grupo arila opcionalmente substituído ou um grupo heteroarila opcionalmente substituído.

O composto da fórmula geral (I) em que I é 1 é o composto em

que a posição 2 do esqueleto de quinazolina é substituído com R, isto é, um composto da fórmula geral (I-2):



em que R e X são os mesmos ou diferentes e representam grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído, um grupo representado por NR^1R^2 , um grupo representado por OR^3 , um grupo representado por $\text{S}(\text{O})_m\text{R}^4$, um grupo nitro ou um átomo de halogênio,

em que R^1 representa um átomo de hidrogênio ou um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído,

R^2 representa um átomo de hidrogênio, um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído, um grupo representado por NR^5R^6 (em que R^5 e R^6 são os mesmos ou diferentes e representam um átomo de hidrogênio ou um grupo C1-C6 alquila opcionalmente substituído) ou um grupo representado por OR^7 (em que R^7 representa um átomo de hidrogênio ou um grupo C1-C6 alquila opcionalmente substituído), ou R^1 e R^2 são empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados para formar um grupo amino cíclico opcionalmente substituído,

R^3 e R^4 cada qual representa um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído,

m representa um número inteiro de 0 a 2,

n representa um número inteiro de 0 a 4,

quando n for 2 ou mais, cada X é o mesmo ou diferente um do outro, e

Ar representa um grupo arila opcionalmente substituído ou um grupo heteroarila opcionalmente substituído.

O composto (I) pode estar na forma do "sal agricolamente aceitável" descrito acima.

Quando o composto (I) tem um ou mais centros assimétricos, o composto inclui dois ou mais estereoisômeros (por exemplo, enantiômero, diastereômero, etc.). O composto da presente invenção inclui todos os estereoisômeros e uma mistura de dois ou mais estereoisômeros.

Quando o composto (I) tem isomerismo geométrico com base

em uma ligação dupla e similares, o composto (I) inclui dois ou mais isômeros geométricos (por exemplo, E/Z ou trans/cis isômeros, S-trans/S-cis isômeros, etc.). O composto (I) inclui todos os isômeros geométricos e uma mistura de dois ou mais isômeros geométricos.

5 Exemplos preferíveis do composto (I) incluem os seguintes compostos.

(1) um composto da fórmula geral (I), em que I é 1 e R é um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído.

10 (2) um composto da fórmula geral (I), em que I é 1 e R é um grupo C1-3 alquila que é opcionalmente substituído com (a) átomo(s) de halogênio ou (um) grupo(s) oxo.

(3) um composto da fórmula geral (I), em que o grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído é um grupo C1-3 alquila que é opcionalmente substituído com (a) átomo(s) de halogênio ou (um) grupo(s) oxo.

15 (4) um composto da fórmula geral (I), em que I é 1 e R é um grupo representado por NR^1R^2 .

(5) um composto do anterior (4), em que R^1 representa um átomo de hidrogênio ou um grupo C1-3 alquila, R^2 representa um átomo de hidrogênio, um grupo amino, um grupo C1-3 alquilamino, um grupo di C1-3 alquilamino, um grupo amidino, um grupo C1-3 alcóxi, um grupo fenila, um grupo C1-3 acila, um grupo C1-6 alquila, um grupo C3-6 alquenila ou um grupo C3-6 alquinila em que o grupo fenila é opcionalmente substituído com os mesmo ou diferentes um a três grupos C1-3 alquila, e o grupo fenila, o grupo acila, o grupo alquila, o grupo alquenila e o grupo alquinila são opcionalmente substituídos com os mesmos ou diferentes 1 a 3 substituintes selecionados a partir do grupo que consiste em um átomo de halogênio, um grupo hidroxila, um grupo C1-3 alcóxi, um grupo hidróxi C1-3 alcóxi, um grupo carboxila, um grupo C1-3 alcóxicarbonila, um grupo carbamoila, um grupo amino, um grupo C1-3 alquilamino, um grupo di C1-3 alquilamino, um grupo mercapto, um grupo C1-3 aciltio, um grupo ciano, um grupo furila e um grupo tetra-hidrofurila, ou R^1 e R^2 são empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados para formar um grupo pirrolidino, um grupo piperidino ou um

20
25
30

grupo morfolino.

(6) um composto do o anterior (4), em que R^1 representa um átomo de hidrogênio, R^2 representa um átomo de hidrogênio, um grupo formila, um grupo C1-6 alquila, um grupo C3-6 alquenila ou um grupo C3-6 alquinila em que o grupo alquila, o grupo alquenila e o grupo alquinila são opcionalmente substituídos com (a) substituinte(s) selecionado(s) a partir do grupo que consiste em um grupo hidroxila, um grupo metóxi, um grupo metoxycarbonila, um grupo etoxycarbonila, um grupo ciano e um grupo furila.

(7) um composto da fórmula geral (I), em que I é 1 e R é um grupo representado por OR^3 .

(8) um composto do anterior (7), em que R^3 é um grupo C1-3 alquila que é opcionalmente substituído com um grupo amino.

(9) um composto da fórmula geral (I), em que I é 1 e R é um grupo representado por $S(O)_mR^4$.

(10) um composto do anterior (9), em que R^4 é um grupo C1-3 alquila que é opcionalmente substituído com um grupo amino ou um grupo hidroxila, e m é 0.

(11) um composto da fórmula geral (I), em que I é 1 e R é um átomo de halogênio.

(12) um composto do anterior (11), em que o átomo de halogênio é um átomo de cloro.

(13) um composto da fórmula geral (I), em que n é de 1 a 2 e X é um grupo C1-3 alquila, um grupo C1-3 alcóxi, um grupo C1-3 haloalquila, um grupo ciano, um átomo de halogênio ou um grupo nitro.

(14) um composto do anterior (13), em que X é um átomo de cloro, um átomo de bromo ou um grupo nitro, e X é substituído na posição 6 e/ou na posição 8.

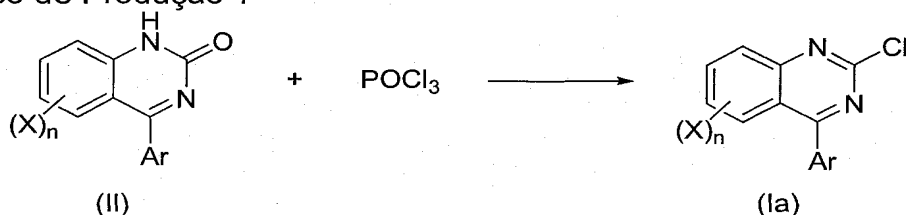
(15) um composto da fórmula geral (I), em que Ar é um grupo fenila que é opcionalmente substituído com (a) átomo(s) de halogênio ou (a) grupo(s) C1-3 alquila.

O composto (I) inclui compostos conhecidos e pode ser preparado por um método conhecido ou um método análogo a ele.

Por exemplo, um composto (Ia) em que I é 1 e R é um átomo de cloro pode ser preparado aquecendo-se um composto (II) com oxicloreto de fósforo de acordo com o seguinte processo de produção 1.

Exemplo de Documento: JP-UNS 62-145073

5 Processo de Produção 1



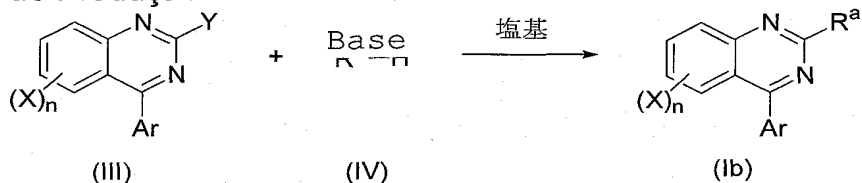
em que símbolos são como definidos acima.

A reação pode ser realizada em um solvente que não adversamente afeta a reação, e é normalmente realizada na ausência de um solvente e utilizando uma quantidade em excesso de oxicloreto de fósforo (5 equivalentes a 30 equivalentes com base no composto (II)). A temperatura de reação é normalmente de 80 a 200°C, preferivelmente de 90°C à temperatura de refluxo (105°C). O tempo de reação é normalmente de 0,1 a 96 horas, preferivelmente de 0,5 a 5 horas, mais preferivelmente 0,5 a 2 horas. Quando a reação proceder lentamente ainda sob refluxo, a reação pode da mesma forma ser aquecida a cerca de 200°C e pressurizada (por exemplo, a 1,1 a 100 de pressão atmosférica) em um vaso fechado resistente à pressão.

Um composto (Ib) em que I é 1 e R é um grupo R^a que é diferente de um átomo de halogênio pode estar preparado, por exemplo, reagindo-se um composto (III) com um composto (IV) de acordo com o seguinte processo de produção 2.

Exemplo de Documento: Journal of the Chemical Society of Japan, 1973, p1944; JP-UNS 58-88369

20 Processo de Produção 2



em que Y representa um grupo de saída (por exemplo, um átomo de halogênio tal como flúor, cloro, bromo ou iodo; um grupo alcano- ou areno-

sulfonilóxi tal como um grupo metanossulfonilóxi, um grupo benzenossulfonilóxi ou um grupo p-toluenossulfonilóxi; um grupo alcano-, areno- ou arenoalcano-sulfonila tal como metanossulfonila, benzenossulfonila, ou fenilmetanossulfonila, etc.); R^a tem o mesmo significado como aquele de R, contanto que R^a não seja um átomo de halogênio; e outros símbolos são como definidos acima.

A reação pode ser realizada com ou sem utilizar um solvente. Exemplos do solvente incluem hidrocarboneto alifático tal como pentano, hexano, heptano, éter de petróleo, ou cicloexano; éster tal como acetato de metila, acetato de etila, formato de etila, ou propionato de etila; cetona tal como acetona, ou metil etil cetona; éter tal como éter dietílico, éter terc-butil metílico, éter di-isopropílico, éter dibutílico, tetra-hidrofurano, ou dioxano; álcool tal como metanol, etanol, ou isopropanol; nitrilo tal como acetonitrilo, ou propionitrilo; amida de ácido tal como dimetilformamida, ou dimetilacetamida; amida cíclica tal como 1-metil-2-pirrolidona; amida fosfórica tal como hexametilfosforamida; ureia cíclica tal como 1,3-dimetil-2-imidazolidinona; sulfóxido tal como dimetil sulfóxido; sulfona tal como sulfolano; hidrocarboneto halogenado tal como diclorometano, clorofórmio, 1,2-dicloroetano, ou tetracloreto de carbono; amina aromática tal como piridina, picolina, lutidina, ou quinolina; suas misturas, água, e misturas dos solventes e água.

Quando uma mistura do solvente e água é usada e a reação não é um sistema de reação homogêneo, um catalisador de transferência de fase (por exemplo, um sal de amônio quaternário tal como cloreto de benziltriethylamônio, ou brometo de benziltriethylamônio, éter coroa tal como 18-coroa-6, etc.) pode ser usado.

Exemplos da base incluem alcoolato de metal de álcali tal como etilato de sódio, metilato de sódio, ou terc-butóxido de potássio; uma base orgânica tal como piridina, picolina, lutidina, quinolina, trietilamina, diisopropiletilamina, 4-dimetilaminopiridina, ou N,N-dimetilanilina; uma base inorgânica tal como carbonato de potássio, carbonato de sódio, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, carbonato de hidrogênio de sódio, ou carbonato de hidrogênio de potássio; hidreto de metal tal como hidreto de lítio, hidreto

de sódio, ou hidreto de potássio; e um reagente de lítio orgânico tal como butil lítio, ou di-isopropilamida de lítio.

A quantidade da base a ser usada não está particularmente limitada contanto que não adversamente influencie a reação. Uma quantidade em excesso grande da base pode da mesma forma ser usada como um sol-
5 vente.

Quando o composto (IV) for uma amina, uma quantidade em excesso do composto (IV) pode da mesma forma ser usada como igualmente uma base e um solvente.

10 A temperatura de reação é normalmente de -50 a 200°C, preferivelmente de temperatura ambiente a 150°C. O tempo de reação é normalmente de 0,1 a 96 horas, preferivelmente de 0,1 a 72 horas, mais preferivelmente de 0,1 a 24 horas.

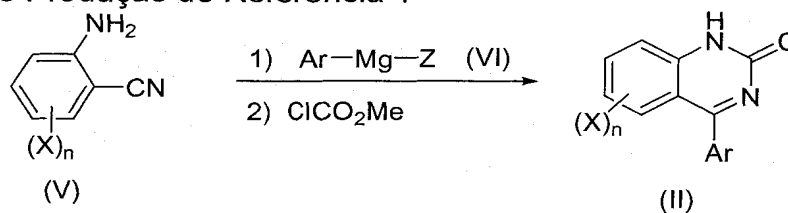
Quando o composto (IV) for um composto de ponto de ebulição
15 baixo tal como amônia, metilamina ou etilamina ou quando a reação proceder lentamente, a reação pode da mesma forma ser aquecida em uma temperatura de cerca de 40 a 150°C e pressurizada (por exemplo, em 1,1 a 100 de pressão atmosférica) em um vaso fechado resistente à pressão.

O composto (II) inclui um composto conhecido e pode ser preparado
20 rado por um método conhecido ou um método análogo a ele.

Por exemplo, o composto (II) pode ser preparado reagindo-se um composto (V) com um composto (VI) e clorocarbonato de metila de acordo com o seguinte processo de produção de referência 1.

Exemplo de Documento: Tetrahedron 42, 3697(1986)

25 Processo de Produção de Referência 1



em que Z representa um átomo de halogênio tal como cloro, bromo ou iodo, e outros símbolos são como definidos acima.

Nesta reação, primeiro, o composto (V) é reagido com o composto (VI). Um solvente é normalmente usado. Exemplos do solvente incluem hidrocarboneto alifático tal como pentano, hexano, heptano, ou éter de petróleo; hidrocarboneto aromático tal como benzeno, tolueno, ou xileno; éter tal como éter dietílico, éter terc-butil metílico, éter di-isopropílico, éter dibutílico, tetra-hidrofurano, ou dioxano, e uma mistura de dois ou mais tipos deles.

O composto (VI) é normalmente usado em uma quantidade de 1 a 5 equivalentes, preferivelmente 2 a 2,5 equivalentes com base no composto (V).

Neste estágio, a temperatura de reação é normalmente de 40 a 100°C, preferivelmente de 50 a 70°C.

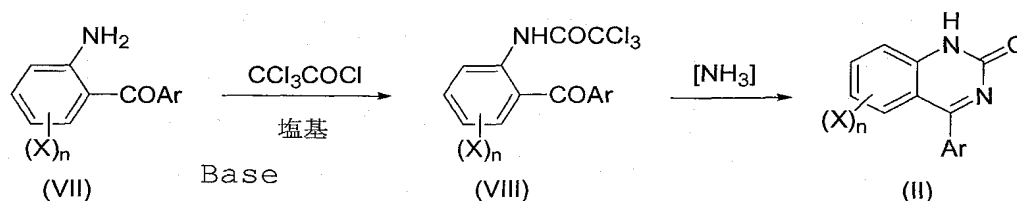
O tempo de reação é normalmente de 0,2 a 96 horas, preferivelmente de 0,5 a 24 horas, mais preferivelmente de 1 a 3 horas.

Logo, clorocarbonato de metila é adicionado ao sistema de reação. Clorocarbonato de metila é normalmente usado em uma quantidade de 1 a 5 equivalentes, preferivelmente 1 a 2 equivalentes com base no composto (V). Neste estágio, é preferido que clorocarbonato de metila seja adicionado depois de resfriar a uma temperatura de 0 a 20°C, seguido por aquecimento. A temperatura de reação sob aquecimento é normalmente de 40 a 200°C, preferivelmente de 50 a 70°C. O tempo de reação total é normalmente de 0,2 a 96 horas, preferivelmente de 0,5 a 10 horas, mais preferivelmente de cerca de 1 a 3 horas.

O composto (II) pode da mesma forma ser preparado reagindo-se um composto (VII) com cloreto de tricloroacetila para produzir um composto (VIII) e reagindo-se o composto (VIII) com amônia ou um sal de amônia com uma substância de ácido fraco de acordo com o seguinte processo de produção de referência 2.

Exemplo de Documento: Chem. Pharm. Bull., 26, 1633 (1978)

30 Processo de Produção de Referência 2



em que símbolos são como definidos acima.

Na primeira reação, cloreto de tricloroacetila é reagido com o composto (VII) na presença de uma base. A reação pode ser realizada na ausência de um solvente, e é normalmente realizada na presença de um solvente. Exemplos do solvente incluem hidrocarboneto alifático, hidrocarboneto aromático, éster, cetona, éter, nitrilo, amida de ácido, amida cíclica, amida fosfórica, ureia cíclica, sulfóxido, sulfona, hidrocarboneto halogenado descrito no Exemplo de Produção 2, e suas misturas. Exemplos da base incluem as bases descritas no Exemplo de Produção 2. Entre estas bases, uma base orgânica ou uma base inorgânica é preferida, e trietilamina é geralmente usada.

A temperatura de reação é normalmente de -50 a 100°C, preferivelmente 0 a 20°C. O tempo de reação é normalmente de cerca de 0,1 a 96 horas, preferivelmente de 0,2 a 5 horas, mais preferivelmente de 0,5 a 3 horas.

Na segunda reação, o composto (VIII) preparado na primeira reação é reagido com amônia ou um composto que gera amônia no sistema. Exemplos do composto incluem sais com substâncias ácidas fracas de amônia, tal como carbonato de amônio, formato de amônio, ou acetato de amônio. Na reação, o solvente como descrito no Exemplo de Produção 2 é normalmente usado. Exemplos preferíveis do solvente incluem amida de ácido, amida cíclica, amida fosfórica, ureia cíclica, sulfóxido, e sulfona.

A temperatura de reação é normalmente de 20 a 200°C, preferivelmente de 50 a 120°C.

O tempo de reação é normalmente de 0,2 a 96 horas, preferivelmente de 0,5 a 10 horas, mais preferivelmente de 1 a 5 horas.

O composto (III) inclui um composto conhecido e pode ser preparado por um método conhecido ou um método análogo a ele.

Por exemplo, o composto (III) em que Y é que um átomo de cloro é um composto (Ia) incluído no composto (I) e pode ser preparado pelo método descrito acima.

O composto (IV), o composto (V), o composto (VI) e o composto (VII) são normalmente compostos conhecidos, e estão comercialmente disponíveis ou podem ser preparados por um processo de produção conhecido. Particularmente, o composto (VI) é um composto chamado um reagente de Grignard. O composto (VI) pode ser um produto comercialmente disponível, ou pode ser preparado por um processo de produção conhecido e em seguida usado como está sem isolamento e purificação.

Compostos preparados pelo processo de produção 1, 2 e o processo de produção de referência 1, 2 descritos acima podem ser isolados e purificados por meios conhecidos, por exemplo, concentração, concentração sob pressão reduzida, extração, dissolução, cristalização, recristalização, ou cromatografia.

Um composto representado pela fórmula geral (XI) (em seguida, às vezes, referido como o composto (XI)) ou um sal agricolamente aceitável do mesmo pode da mesma forma ser usado como o ingrediente ativo de um regulador de crescimento da planta. Um certo composto de quinazolina tendo um grupo amino substituído na posição 2 é conhecido (folheto de WO 2005/042501).

Exemplos do "grupo C1-6 alquila" representados por R¹¹ em um composto representado pela fórmula geral (XI) da presente invenção (em seguida pode ser referido como um composto (XI)), incluem metila, etila, propila, isopropila, butila, isobutyla, sec-butyla, terc-butyla, pentila, 3-metilbutyla, e hexila. Exemplos do "grupo C3-6 alquenila" incluem alila, 2-butenila, 3-butenila, e 3-metil-2-butenila. Exemplos do "grupo C3-6 alquinila" incluem propargila, 2-butinila, e 3-pentinila. Exemplos do "grupo C4-6 alquila" incluem butyla, isobutyla, sec-butyla, terc-butyla, pentila, 3-metilbutyla, e hexila. Exemplos do "grupo C1-3 alcóxicarbonilmetila" incluem metoxicarbonilmetila, etoxicarbonilmetila, propiloxicarbonilmetila, e isopropiloxicarbonilmetila. Exemplos do "grupo C1-3 alcóxiC1-3 alquila" incluem 2-metoxietila, 2-

metoxipropila, 3-metoxipropila, 2-etoxietila, e 3-etoxipropila.

O "grupo C1-6 alquila", "grupo C3-6 alquenila", "grupo C3-6 alquinila" e "grupo C4-6 alquila" descritos acima podem ter um ou mais substituintes, preferivelmente um a três substituintes selecionados a partir de um grupo hidroxila, um grupo C1-3 alcóxi, um grupo C1-3 alcoxicarbonila, um grupo ciano, um grupo 2-furila e um grupo 2-tetra-hidrofurila em posições substituíveis. Quando o número de substituintes for 2 ou mais, os substituintes podem ser os mesmos ou diferentes.

Exemplos do "grupo C1-3 alcóxi" descritos como um exemplo do substituinte incluem metóxi, etóxi, propilóxi, e isopropilóxi. Exemplos do "grupo C1-3 alcoxicarbonila" incluem metoxicarbonila, etoxicarbonila, propiloxicarbonila, e isopropiloxicarbonila.

O composto (XI) pode formar um sal de adição de ácido. Exemplos do sal de adição de ácido incluem um sal de ácido inorgânico tal como cloridrato, bromidrato, hidriodeto, fosfato, sulfato, nitrato, ou perclorato; e um sal de ácido orgânico tal como formato, acetato, tartarato, malato, citrato, oxalato, succinato, benzoato, picrato, metanossulfonato, ou p-toluenossulfonato.

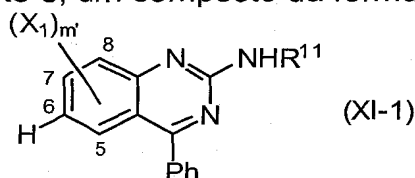
Quando o composto (XI) tem um grupo ácido tal como um grupo carboxila, um grupo hidroxila fenólico ou um grupo metileno ativo, exemplos do sal que pode ser formado incluem sais de metal tal como sais de metal de álcali (sal de lítio, sal de sódio, sal de potássio, etc.) e sais de metal alcalino terroso (sal de magnésio, sal de cálcio, sal de bário, etc.); sal de amônio; e sais de adição salga com bases orgânicas (por exemplo, dimetilamina, trietilamina, piperazina, pirrolidina, piperidina, 2-feniletilamina, benzilamina, etanolamina, dietanolamina, piridina, colidina, etc.).

Desse modo, o composto (XI) pode estar na forma de um sal agricolamente aceitável como descrito acima.

Quando o composto (XI) tem um ou mais centros assimétricos, o composto inclui dois ou mais estereoisômeros (por exemplo, enantiômero, diastereômero, etc.). O composto da presente invenção inclui todos os estereoisômeros e uma mistura de dois ou mais estereoisômeros.

Quando o composto (XI) tem isomerismo geométrico com base em uma ligação dupla e similares, o composto inclui dois ou mais isômeros geométricos (por exemplo, E/Z ou trans/cis isômero, S-trans/S-cis isômero, etc.). O composto (XI) inclui todos os isômeros geométricos e uma mistura de dois ou mais isômeros geométricos.

O composto da fórmula geral (XI) em que m é um número inteiro de 1 a 3 e n é 0 é o composto em que a posição 6 do esqueleto de quinazolina é não-substituída, isto é, um composto da fórmula geral (XI-1):



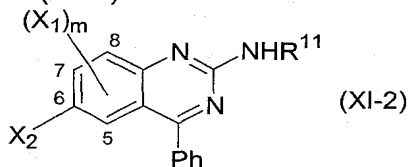
em que Ph representa um grupo fenila, R^{11} representa um átomo de hidrogênio, um grupo formila, um grupo C1-6 alquila, um grupo C3-6 alquenila ou um grupo C3-6 alquinila, e o grupo alquila, o grupo alquenila e o grupo alquinila são opcionalmente substituídos com pelo menos um substituinte selecionado a partir de um grupo hidroxila, um grupo C1-3 alcóxi, um grupo C1-3 alcóxicarbonila, um grupo ciano, um grupo 2-furila e um grupo 2-tetra-

hidrofurila,

m' representa um número inteiro de 1 a 3,
 X_1 representa um átomo de cloro, um átomo de bromo, um grupo trifluorometila, um grupo ciano ou um grupo nitro,

quando m' for 2 ou mais, cada X_1 é o mesmo ou diferente um do outro, contanto que quando m' for 1, X_1 é um átomo de cloro e R^{11} representa um grupo metila, X_1 é um átomo de 8-cloro.

O composto da fórmula geral (XI) em que n é 1 é o composto em que a posição 6 do esqueleto de quinazolina é substituída com X_2 , isto é, um composto da fórmula geral (XI-2):



em que Ph representa um grupo fenila, R^{11} representa um átomo de hidro-

gênio, um grupo formila, um grupo C1-6 alquila, um grupo C3-6 alquenila ou um grupo C3-6 alquinila, e o grupo alquila, o grupo alquenila e o grupo alquinila são opcionalmente substituídos com pelo menos um substituinte selecionado a partir de um grupo hidroxila, um grupo C1-3 alcóxi, um grupo C1-3 alcóxicarbonila, um grupo ciano, um grupo 2-furila e um grupo 2-tetra-hidrofurila,

m representa um número inteiro de 0 a 3,

X_1 e X_2 podem ser os mesmos ou diferentes e representam um átomo de cloro, um átomo de bromo, um grupo trifluorometila, um grupo ciano ou um grupo nitro,

quando m for 2 ou mais, cada X_1 é o mesmo ou diferente um do outro, contanto que quando qualquer um das seguintes condições (1) a (3) está satisfeita, m representa um número inteiro de 1 a 3:

(1) X_2 é um átomo de cloro, e R^{11} é um grupo selecionado a partir de um átomo de hidrogênio, um grupo metila, um grupo 2-hidroxietila, um grupo 3-hidroxipropila, um grupo 2,2-dimetoxietila e um grupo cianometila,

(2) X_2 é um átomo de bromo, e R^{11} é selecionado a partir de um grupo 2-hidroxietila, um grupo 3-hidroxipropila e um grupo 2-metoxietila, e

(3) X_2 é um grupo nitro, e R^{11} é um grupo 3-hidroxipropila.

Exemplos preferíveis do composto (XI) incluem os seguintes compostos.

(1) um composto da fórmula geral (XI), em que R^{11} é um átomo de hidrogênio, um grupo formila, um grupo metila, um grupo etila, um grupo 2-hidroxietila, um grupo 3-hidroxipropila, um grupo 2-metoxietila, um grupo furfurila, um grupo metoxycarbonilmetila ou um grupo etoxycarbonilametila, m é 0, n é 1, e X_2 é um átomo de cloro ou um grupo nitro.

(2) um composto da fórmula geral (XI), em que R^{11} é um átomo de hidrogênio, um grupo formila, um grupo metila, um grupo etila, um grupo 2-hidroxietila, um grupo 2-metoxietila, um grupo furfurila, um grupo metoxycarbonilmetila ou um grupo etoxycarbonilametila, m é 1, n é 1, X_1 é um átomo de 8-cloro, e X_2 é um átomo de cloro ou um grupo nitro.

(3) um composto da fórmula geral (XI), em que m é um número inteiro de 1 a

3, e n é 0.

(4) um composto da fórmula geral (XI), em que R^{11} é um grupo formila, um grupo C4-6 alquila, um grupo C3-6 alquenila ou um grupo C3-6 alquinila em que o grupo alquila, o grupo alquenila e o grupo alquinila são opcionalmente substituídos com (a) grupo(s) hidroxila ou (a) grupo(s) C1-3 alcóxi, ou R^{11} é um grupo C1-3 alcóxi C1-3 alquila ou um grupo furfurila, m é 0, n é 1, e X_2 é um átomo de cloro.

(5) um composto da fórmula geral (XI), em que n é 1.

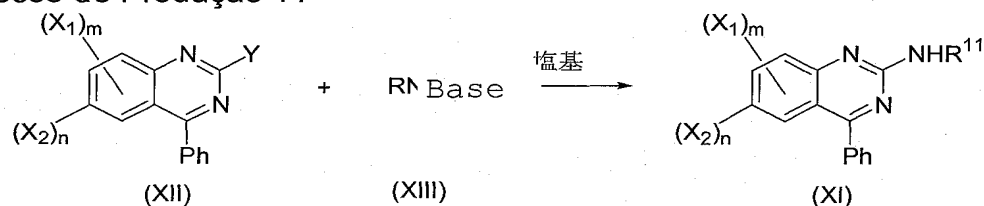
(6) um composto da fórmula geral (XI), em que m é 1 a 3, e n é 1.

(7) um composto da fórmula geral (XI), em que R^{11} é um grupo C1-3 alcóxi-carbonilmetila ou um grupo furfurila.

(8) um composto da fórmula geral (XI), em que n é 1, e X_2 é um grupo trifluorometila ou um grupo ciano.

O composto (XI) é uma nova substância e pode ser preparado reagindo-se um composto (XII) com um composto (XIII) de acordo com o seguinte processo de produção 11.

Processo de Produção 11



em que Y representa um grupo de saída (por exemplo, um átomo de halogênio tal como flúor, cloro, bromo ou iodo; um grupo alcano- ou areno-sulfonilóxi tal como um grupo metanossulfonilóxi, um grupo benzenossulfonilóxi ou um grupo p-toluenossulfonilóxi; ou um grupo alcano-, areno- ou arenoalcano-sulfonila tal como metanossulfonila, benzenossulfonila ou fenilmetanossulfonila), e outros símbolos são como definidos acima.

A reação pode ser realizada com ou sem utilizar um solvente. Exemplos do solvente incluem hidrocarboneto alifático tal como pentano, hexano, heptano, éter de petróleo, ou cicloexano; éster tal como acetato de metila, acetato de etila, formato de etila, ou propionato de etila; cetona tal como acetona, ou metil etil cetona; éter tal como éter dietílico, éter terc-butil

metílico, éter di-isopropílico, éter dibutílico, tetra-hidrofurano, ou dioxano; álcool tal como metanol, etanol, ou isopropanol; nitrilo tal como acetonitrilo, ou propionitrilo; amida de ácido tal como dimetilformamida, ou dimetilacetamida; amida cíclica tal como 1-metil-2-pirrolidona; amida fosfórica tal como hexametilfosforamida; ureia cíclica tal como 1,3-dimetil-2-imidazolidinona; sulfóxido tal como dimetil sulfóxido; sulfona tal como sulfolano; hidrocarbureto halogenado tal como diclorometano, clorofórmio, 1,2-dicloroetano, ou tetracloreto de carbono; amina aromática tal como piridina, picolina, lutidina, ou quinolina; suas misturas, água, e misturas dos solventes e água.

Quando uma mistura do solvente com água é usada e a reação não é um sistema homogêneo, um catalisador de transferência de fase (por exemplo, um sal de amônio quaternário tal como cloreto de benziltriethylamônio, ou brometo de benziltriethylamônio, éter coroa tal como 18-coroa-6, etc.) pode ser usado.

Exemplos da base incluem alcoolato de metal de álcali tal como etilato de sódio, metilato de sódio, ou terc-butóxido de potássio; uma base orgânica tal como piridina, picolina, lutidina, quinolina, trietilamina, diisopropiletilamina, 4-dimetilaminopiridina, ou N,N-dimetilanilina; uma base inorgânica tal como carbonato de potássio, carbonato de sódio, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, carbonato de hidrogênio de sódio, ou carbonato de hidrogênio de potássio; hidreto de metal tal como hidreto de lítio, hidreto de sódio, ou hidreto de potássio; e um reagente de lítio orgânico tal como butil lítio, ou di-isopropilamida de lítio.

A quantidade da base a ser usada não está particularmente limitada contanto que não adversamente influencie a reação. Uma quantidade em excesso grande da base pode da mesma forma ser usada como um solvente.

Quando o composto (XIII) for uma amina, uma quantidade em excesso do composto (XIII) pode da mesma forma ser usada como uma base e um solvente.

A temperatura de reação é normalmente de -50 a 200°C, preferivelmente de temperatura ambiente a 150°C. O tempo de reação é normal-

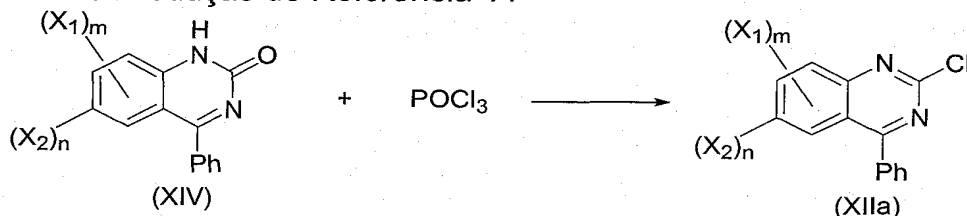
mente de 0,1 a 96 horas, preferivelmente de 0,1 a 72 horas, mais preferivelmente de 0,1 a 24 horas.

Quando o composto (XIII) for um composto de ponto de ebulição baixo tal como amônio, metilamina ou etilamina ou quando a reação proceder lentamente, a reação pode da mesma forma ser aquecida em uma temperatura de cerca de 40 a 150°C e pressurizada (por exemplo, em 1,1 a 100 de pressão atmosférica) em um vaso fechado resistente à pressão.

O composto (XII) inclui um composto conhecido e pode ser preparado por um método conhecido ou um método análogo a ele. Por exemplo, um composto (XIIa) em que Y é um átomo de cloro pode ser preparado reagindo-se um composto (XIV) com oxicloreto de fósforo de acordo com o seguinte processo de produção de referência 11.

Exemplo de Documento: JP-UNS 62-145073

Processo de Produção de Referência 11



em que símbolos são como definidos acima.

A reação anterior pode ser realizada em um solvente que não adversamente afeta a reação, e é normalmente realizada na ausência de um solvente utilizando uma quantidade em excesso de oxicloreto de fósforo (5 equivalentes a 30 equivalentes com base no composto (XIV)).

A temperatura de reação é normalmente de 80 a 200°C, preferivelmente de 90°C à temperatura de refluxo (105°C).

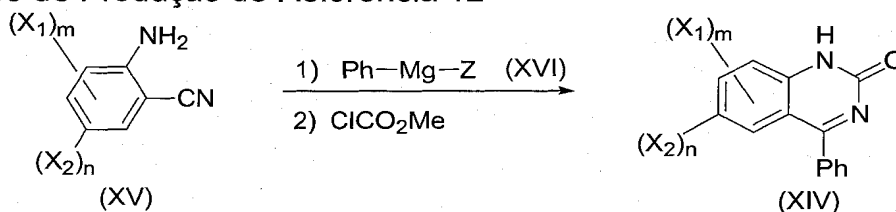
O tempo de reação é normalmente de 0,1 a 96 horas, preferivelmente de 0,5 a 5 horas, mais preferivelmente 0,5 a 2 horas. Quando a reação proceder lentamente ainda sob refluxo, a reação pode da mesma forma ser aquecida em uma temperatura de cerca de 200°C e pode ser pressurizada (por exemplo, em 1,1 a 100 de pressão atmosférica) em um vaso fechado resistente à pressão.

O composto (XIV) inclui um composto conhecido e pode ser pre-

parado por um método conhecido ou um método análogo a ele. Por exemplo, o composto (XIV) pode ser preparado reagindo-se um composto (XV) com um composto (XVI) e clorocarbonato de metila de acordo com o seguinte processo de produção de referência 12.

5 Exemplo de Documento: Tetrahedron 42, 3697 (1986)

Processo de Produção de Referência 12



em que Z representa um átomo de halogênio tal como cloro, bromo, ou iodo, e outros símbolos são como definidos acima.

Na reação, primeiro, um composto (XV) é reagido com um com-
 10 posto (XVI). Um solvente é normalmente usado, e exemplos do mesmo in-
 cluem hidrocarboneto alifático tal como pentano, hexano, heptano, ou éter
 de petróleo; hidrocarboneto aromático tal como benzeno, tolueno, ou xileno;
 éter tal como éter dietílico, éter terc-butil metílico, éter di-isopropílico, éter
 dibutílico, tetra-hidrofurano, ou dioxano, e uma mistura de dois ou mais tipos
 15 deles.

O composto (XVI) é normalmente usado na quantidade de 1 a 5
 equivalentes, preferivelmente 2 a 2,5 equivalentes com base no composto
 (XV).

A temperatura de reação é normalmente de 40 a 100°C, preferi-
 20 velmente de 50 a 70°C.

O tempo de reação é normalmente de 0,2 a 96 horas, preferi-
 velmente de 0,5 a 24 horas, mais preferivelmente de 1 a 3 horas.

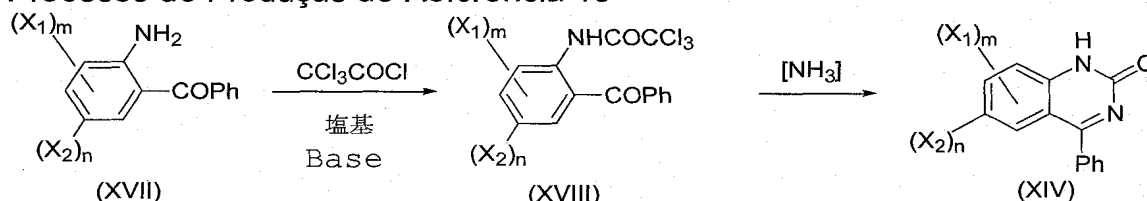
Logo, clorocarbonato de metila é adicionado ao sistema de rea-
 ção. Clorocarbonato de metila é normalmente usado em uma quantidade de
 25 1 a 5 equivalentes, preferivelmente 1 a 2 equivalentes com base no compos-
 to (XV). Neste estágio, é preferido que clorocarbonato de metila seja adicio-
 nado depois de resfriar em uma temperatura de 0 a 20°C, seguido por aque-
 cimento. A temperatura de reação sob aquecimento é normalmente de 40 a

200°C, preferivelmente de 50 a 70°C. O tempo de reação total é normalmente de 0,2 a 96 horas, preferivelmente de 0,5 a 10 horas, mais preferivelmente de cerca de 1 a 3 horas.

- 5 O composto (XIV) pode da mesma forma ser preparado reagindo-se um composto (XVII) com cloreto de tricloroacetila para produzir um composto (XVIII) e reagindo-se o composto (XVIII) com amônia ou uma substância ácida fraca de amônia de acordo com o seguinte processo de produção de referência 13.

Exemplo de Documento: Chem. Pharm. Bull, 26, 1633 (1978)

10 Processo de Produção de Referência 13



em que símbolos são como definidos acima.

- Na primeira reação, cloreto de tricloroacetila é reagido com o composto (XVII) na presença de uma base. A reação pode ser realizada na ausência de um solvente, e é normalmente realizada na presença de um solvente. Exemplos do solvente incluem hidrocarboneto alifático, hidrocarboneto aromático, éster, cetona, éter, nitrilo, amida ácida, amida cíclica, amida fosfórica, ureia cíclica, sulfóxido, sulfona, hidrocarboneto halogenado descrito no Exemplo de Produção 11, e suas misturas.
- 15

- Exemplos da base incluem as bases descritas no Exemplo de Produção 11. Entre estas bases, uma base orgânica ou uma base inorgânica é preferida, e trietilamina é geralmente usada.
- 20

A temperatura de reação é normalmente de -50 a 100°C, preferivelmente 0 a 20°C.

- O tempo de reação é normalmente de cerca de 0,1 a 96 horas, preferivelmente de 0,2 a 5 horas, mais preferivelmente de 0,5 a 3 horas.
- 25

Na segunda reação, o composto (XVIII) preparado na primeira reação é reagido com amônia ou um composto que gera amônia no sistema.

Exemplos do composto incluem sais com substâncias ácidas fracas de amônia, tal como carbonato de amônio, formato de amônio, ou acetato de amônio. Na reação, o solvente como descrito no Exemplo de Produção 11 é normalmente usado. Exemplos preferíveis do solvente incluem amida de
5 ácido, amida cíclica, amida fosfórica, ureia cíclica, sulfóxido, e sulfona.

A temperatura de reação é normalmente de 20 a 200°C, preferivelmente de 50 a 120°C.

O tempo de reação é normalmente de 0,2 a 96 horas, preferivelmente de 0,5 a 10 horas, mais preferivelmente de 1 a 5 horas.

10 O composto (XIII), o composto (XV), o composto (XVI) e o composto (XVII) são compostos normalmente conhecidos, e estão comercialmente disponíveis ou podem ser preparados por um processo de produção conhecido.

Particularmente, o composto (XVI) é um composto chamado um
15 reagente de Grignard. O composto (XVI) pode ser um produto comercialmente disponível, ou pode ser preparado por um processo de produção conhecido e em seguida usado como está sem isolamento e purificação.

Compostos preparados pelo processo de produção 11 e o processo de produção de referência 11, 12 e 13 podem ser isolados e purificados por meios conhecidos, por exemplo, concentração, concentração sob
20 pressão reduzida, extração, dissolução, cristalização, recristalização, ou cromatografia.

O crescimento de uma planta na presente invenção é normalmente regulado aplicando-se uma quantidade eficaz de um regulador de
25 crescimento da planta a uma planta ou hábitat da planta.

Quando o regulador de crescimento da planta da presente invenção for usado para agricultura e silvicultura, a quantidade de aplicação é normalmente 0,01 a 1,000 g/1000m². Quando o regulador de crescimento da planta da presente invenção é a forma de um concentrado emulsificável, um
30 pó umectável, uma formulação fluível, ou uma microcápsula, é normalmente pulverizada depois da diluição com água para ter uma concentração de ingrediente ativo de 0,001 a 10,000 ppm. Quando o regulador de crescimento

da planta da presente invenção estiver na forma de um pó ou um grânulo, é normalmente aplicado no estado em que se encontra.

Para o propósito de promover o crescimento de raízes da plantas no solo de um campo cultivado, o solo pode ser tratado diretamente com o regulador de crescimento da planta desse modo formulado da presente invenção ou com uma diluição do regulador de crescimento da planta. Além disso, o regulador de crescimento da planta pode ser formulado em uma formulação de resina na forma de uma folha ou filamento. A formulação de resina pode ser aplicada enrolando-se ao redor das plantas, prolongando-se na redondeza da plantas, assentando-se na superfície do solo aos pés da planta, ou similar. O regulador de crescimento da planta da presente invenção pode da mesma forma ser usado por tratamento de folhagem ou tratamento de brotos. Sementeiras antes do plantio ou orifícios para o plantio ou pés da planta no plantio podem ser da mesma forma tratados com o regulador de crescimento da planta da presente invenção. Plantas alvo são tratadas com o regulador de crescimento da planta uma vez ou em tempos plurais.

Quando o regulador de crescimento da planta da presente invenção for usado para tratamento de folhagem de um corpo da planta ou tratamento de solo, a quantidade de aplicação pode variar, dependendo do tipo de formulação, da cronometragem, método e lugar de aplicação, e da planta alvo, e é normalmente de 0,1 a 10.000 g por hectare. Quando o regulador de crescimento da planta for usado como uma diluição com água, a concentração do regulador de crescimento da planta pode variar, dependendo do tipo de formulação, da cronometragem, método e lugar de aplicação, e da planta alvo, e é normalmente de 0,001 a 10.000 ppm, preferivelmente de 0,01 a 1.000 ppm.

O regulador de crescimento da planta da presente invenção pode da mesma forma ser usado para um tratamento de uma planta antes da transplantação. Quando o regulador de crescimento da planta da presente invenção é diretamente absorvido em uma planta antes do transplante, a porção de raiz ou toda a planta pode ser imersa em uma solução ou suspen-

são do regulador de crescimento da planta com uma concentração de 0,001 ppm a 10.000 ppm.

Sementes da planta alvo podem ser diretamente tratadas com uma formulação do regulador de crescimento da planta da presente invenção. Exemplos de um tal método de tratamento incluem um método que compreende imergir sementes de uma planta no regulador de crescimento da planta da presente invenção preparado de forma que a concentração de um ingrediente ativo possa ser 1 a 10.000 ppm, um método que compreende pulverização ou revestimento de uma planta com o regulador de crescimento da planta da presente invenção preparado de forma que a concentração de um ingrediente ativo possa ser de 1 a 10.000 ppm, e um método que compreende cobrir as sementes de uma planta com pó do regulador de crescimento da planta da presente invenção.

O regulador de crescimento da planta da presente invenção pode ser misturado com um meio de cultura de água para cultura de água, ou pode ser usado como um dentre os componentes do meio para cultura de tecido. Quando o regulador de crescimento da planta da presente invenção for usado para cultura de água, o regulador de crescimento da planta pode ser dissolvido ou suspenso em um meio de cultura de água tal como Enshi em uma concentração de 0,001 ppm a 10.000 ppm. Quando o regulador de crescimento da planta da presente invenção for usado para cultura de tecido ou cultura de célula, o regulador de crescimento da planta pode ser dissolvido ou suspenso em um meio de cultura de tecido da planta convencionalmente usado, tal como um meio de MS em uma concentração de 0,001 ppm a 10.000 ppm. Neste caso, sacarídeos como uma fonte de carbono e vários hormônios da planta podem convencionalmente ser adicionados ao meio.

O regulador de crescimento da planta da presente invenção pode da mesma forma ser usado em combinação com um fungicida, um inseticida, um acaricida, um nematocida, um herbicida, um regulador de crescimento da planta e/ou um fertilizante.

Suas quantidades de aplicação e concentrações de aplicação podem variar, dependendo do tipo de formulação, da cronometragem, lugar

e método de aplicação, do tipo de uma planta e efeito a ser esperado, e portanto elas podem ser aumentadas ou diminuídas sem limitação às faixas anteriores.

5 No método de regulamento de crescimento da planta como descrito acima, o regulador de crescimento da planta pode ser usado.

É da mesma forma possível especificar uma substância tendo a capacidade para promover o crescimento de uma raiz de uma planta avaliada pelo método para testar a capacidade de uma substância teste promover o crescimento de uma raiz de uma planta que compreende a primeira etapa e a segunda etapa utilizando-se um receptor de citocinina selecionado a partir do grupo A, e em seguida trazer a substância especificada tendo a capacidade para promover o crescimento de uma raiz de uma planta em contato com uma planta para promover o crescimento de uma raiz da planta. Um método para trazer a substância especificada tendo a capacidade para promover o crescimento de uma raiz de uma planta em contato com uma planta inclui o método de formulação e o método de aplicação como descrito acima.

O regulador de crescimento da planta da presente invenção pode ser usado para o propósito de melhoria no estabelecimento de muda e melhoria em uma taxa de remover a raiz no solo por promoção do crescimento de raízes sob cultivo de semeadura de arroz. O regulador de crescimento da planta da presente invenção pode da mesma forma ser usado para o propósito de promoção do crescimento de raízes ao aumento de mudas de arroz em uma caixa de sementeira. O regulador de crescimento da planta da presente invenção pode da mesma forma ser usado para o propósito de melhoria na dilatação de raiz e resistência à seca e calor de verde de um campo de golfe. No caso de colheitas tal como feijão de soja, milho e trigo, o regulador de crescimento da planta da presente invenção pode ser usado para o propósito de melhoria na dilatação da raiz, produtividade de melhoria por estabelecimento de muda em um estágio precoce ou redução na quantidade de aplicação de herbicidas. No caso de cultura de tomate, papel ou similar, o regulador de crescimento da planta da presente invenção pode ser usado para o propósito de melhoria em uma taxa de remover raiz no solo sob

transplantação. No caso de produção de mudas de vegetais, o uso do regulador de crescimento da planta da presente invenção pode ser esperado conduzir a estabelecimento de muda uniforme, e em seguida melhoria em eficiência de transplante mecânico.

5 O regulador de crescimento da planta da presente invenção pode ser usado para controle de domínio apical de uma planta. Por exemplo, o regulador de crescimento da planta da presente invenção pode ser usado para inibir o crescimento de brotos axilares de tabaco, rosa e similares. O regulador de crescimento da planta da presente invenção pode controlar a
10 formação de brotos de flor de colheitas de fruta, florescendo plantas e similares, e portanto pode ser usado como um agente de adelgaçamento de flor. O regulador de crescimento da planta da presente invenção pode da mesma forma aumentar brotos de flor, e desse modo aumento no rendimento de colheitas de fruta ou melhoria na qualidade do florescimento da plantas pode
15 ser alcançada. O regulador de crescimento da planta da presente invenção pode da mesma forma inibir o crescimento de galhos de colheitas de fruta para diminuir o número de galhos ou pode promover o crescimento de galhos de colheitas de fruta para aumentar o número de ramificações, e portanto pode ser usado para controle do crescimento do tronco de uma árvore.

20 O regulador de crescimento da planta da presente invenção pode ser usado para tecnologias de cultura de tecido tal como dediferenciação ao calo ou rediferenciação do calo. Por exemplo, o regulador de crescimento da planta da presente invenção pode ser usado para promover a formação de calo de tecidos da planta. O regulador de crescimento da planta da presente invenção pode ser da mesma forma usado para melhorar a eficiência
25 de rediferenciação de um embrião adventício de feijão de soja ou similares.

 O regulador de crescimento da planta da presente invenção pode ser usado para controlar o envelhecimento de uma planta. Por exemplo, o regulador de crescimento da planta da presente invenção pode ser usado
30 para inibir o envelhecimento de e melhorar a manutenção de flores cortadas da plantas em florescimento tal como cravo. O regulador de crescimento da planta da presente invenção pode da mesma forma ser usado para inibir a

maturação das frutas. O regulador de crescimento da planta da presente invenção pode da mesma forma prevenir o envelhecimento de folhas de mudas de arroz de alagado, e desse modo mudas boas podem ser cultivadas. Plantas tal como algodão podem ser tratadas com o regulador de crescimento da planta da presente invenção antes de colher para promover o envelhecimento das folhas.

O receptor de citocinina derivado da planta consistindo em uma sequência de aminoácido mostrada no grupo anterior B pode ser usado como uma ferramenta de estudo. Por exemplo, pode ser usado como uma ferramenta de estudo para realizar estudo tal como o teste para a capacidade de promover o crescimento de uma raiz de uma planta ou a procura para uma substância química tendo a capacidade de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta como descrito acima. O receptor de citocinina pode da mesma forma ser usado como uma ferramenta de estudo em estudo para analisar um mecanismo de ação de um fármaco que age em um receptor de citocinina.

Um polinucleotídeo codificando uma sequência de aminoácido mostrada no grupo B e um polinucleotídeo tendo uma sequência de nucleotídeo complementar a isso, uma sequência de nucleotídeo parcial de um polinucleotídeo codificando uma sequência de aminoácido mostrada no grupo B ou um polinucleotídeo tendo uma sequência de nucleotídeo complementar à sequência de nucleotídeo parcial, e um polipeptídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 3 ou 4 podem da mesma forma ser usados como ferramentas de estudo. Por exemplo, uma porção deles pode funcionar como um polinucleotídeo a ser usado no processo de produção de um receptor de citocinina como descrito acima. Da mesma forma, uma porção deles pode ser usada como uma ferramenta de estudo importante por obter um polinucleotídeo mostrado no grupo polinucleotídeo B utilizando PCR, ou obtendo um polinucleotídeo mostrado no grupo polinucleotídeo B utilizando hibridização, como descrito acima.

Quando uma avaliação de um regulador de crescimento da planta é realizada, eles podem ser usados como uma ferramenta de teste em

experiências para avaliação. Especificamente, eles podem ser usados como uma ferramenta de teste em experiências para o teste da capacidade para promover o crescimento de uma raiz de uma planta e a avaliação de uma substância química tendo a capacidade de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta como descrito acima.

A presente invenção também inclui um sistema (em seguida, às vezes, referido como o sistema da presente invenção) que compreende um meio para introduzir, armazenar e manusear a informação de dados sobre uma atividade (ou a presença ou ausência de sinalização intracelular ou a quantidade do mesmo) de uma substância teste para inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula (em seguida, às vezes, referido como os meios a), meios para indagar e procurar a informação de dados com base em condições desejadas (em seguida, às vezes, como os meios b), e meios para exibir e emitir os dados indagados e procurados (em seguida, às vezes, chamado meios c).

Primeiro, os meios a são descritos. Como descrito acima, os meios a são meios que introduzem a informação de dados de uma atividade de uma substância teste para inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula, e em seguida armazena e administra a informação de entrada. Tal informação é entrada por uma entrada significa 1 e é normalmente memorizado em meios de memória 2. Os meios de entrada incluem meios capazes de introduzir a informação, tal como um teclado ou um *mouse*. Quando a introdução, armazenamento e administração da informação são concluídos, a informação procede aos meios subsequentes b. No armazenamento e controle da informação, muitos dados podem ser eficazmente armazenados e controlados manuseando-se informação tendo uma estrutura de dados utilizando *hardware* tal como um computador e *software* tal como OS e banco de dados, e armazenando da informação em um próprio dispositivo de armazenamento, por exemplo, um meio de gravador legível pelo computador tal como um disco flexível, um disco fotomagnético, um CD-ROM, um DVD-ROM, ou um disco rígido.

Os meios b são descritos. Como descrito acima, os meios b são

meios que indagam e procuram a informação de dados armazenados e manuseados pelos meios a com base em condições para obter os resultados desejados. Quando condições para investigação e pesquisa são registradas pelos meios de entrada 1 e informação que corresponde às condições é normalmente selecionada a partir da informação armazenada nos meios de armazenamento 2, a informação procede aos meios subsequentes c. Os resultados selecionados são normalmente armazenados nos meios de armazenamento 2 e pode ser exibido pelos meios de exibição e produção 3.

Os meios c são descritos. Como descrito acima, os meios c são meios que exibem e produz os resultados indagados e procurados. Os meios de exibição e produção 3 incluem um *display*, e uma impressora, e os resultados podem ser exibidos em um dispositivo de exibição de um computador, ou produzidos em um papel por impressão.

Exemplos

Em seguida, a presente invenção será descrita em detalhes por meio de Exemplos, porém a presente invenção não está limitada a estes.

O composto (I) usado na presente invenção será descrito mais especificamente por meio de Exemplos de Síntese e Exemplos de Síntese de Referência, porém o composto (I) não está limitado a estes exemplos.

Nestes Exemplos de Síntese e Exemplos de Síntese de Referência, "temperatura ambiente" normalmente significa uma temperatura de 10 a 30°C. ¹H RMN" significa um espectro de ressonância magnética de próton. Utilizando tetrametilsilano como um padrão interno, a medida foi realizada com um espectrômetro (400 MHz), Modelo JNM-AL400, fabricado por JEOL Ltd. e trocas químicas (δ) foram expressas como ppm. "Mp" significa um ponto de fusão e foi medido com um medidor de ponto de fusão, Modelo Mettler FP61.

Abreviações usadas nos seguintes Exemplos de Síntese, Exemplos de Síntese de Referência e Tabelas 3 a 7 têm os seguintes significados. CDCl₃: clorofórmio deuterado, DMSO-d₆: dimetil sulfóxido deuterado, s: singlete, d: duplete, t: o triplete, q: quadruplete, dd: duplete duplo, m: multiplete, br: amplo, J: constante de acoplamento, Me: metila, Et: etila, Pr: propila, i-Pr:

isopropila, t-Bu: terc butil, Ph: fenila, Ac: acetila, THF: tetra-hidrofurano, DMF: N,N-dimetilformamida, DMSO: dimetil sulfóxido e MTBE: éter butil metílico terciário

Exemplo de Síntese 1 (Preparação de 2,8-dicloro-4-fenilquinazolina (composto N° Ia1-11))

Em 1,24 g de 8-cloro-4-fenil-2(1H)-quinazolinona (composto N° II-11) foi adicionado 6,65 g de oxiclreto de fósforo, seguido por agitação a 95°C durante 1 hora. A solução reacional resultante foi vertida em 200 ml de água gelada, e bicarbonato de sódio foi em seguida adicionado, desse modo ajustando o pH em 9. Em seguida, cristais precipitados foram coletados por filtração. O produto coletado foi recristalizado a partir de etanol para obter 1,07 g do composto titulado. Mp.154,4°C. ¹H RMN (CDCl₃): 7,52-7,65 (4H, m), 7,76-7,80 (2H, m), 8,02-8,08 (2H, m).

Exemplo de Síntese 2 (Preparação de 2-amino-6,8-dicloro-4-fenilquinazolina (composto N° IC12-4))

Uma mistura de 300 mg de 2,6,8-tricloro-4-fenilquinazolina (composto N° Ia1-12), 30 g de uma solução de amônia aquosa a 28% e 6 ml de acetonitrilo foi reagido a 105°C durante 1,5 hora em um vaso de reação resistente à pressão. A solução reacional resultante foi resfriada e em seguida vertida em 100 ml de água. A mistura foi extraída com 60 ml de acetato de etila e o extrato resultante foi concentrado. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel (clorofórmio) para obter 230 mg do composto titulado. Mp.212,7°C. ¹H RMN (CDCl₃): 5,56 (2H, br. s), 7,54-7,60 (3H, m), 7,63-7,68 (2H, m), 7,74 (1H, d, J = 2,3 Hz), 7,79 (1H, d, J = 2,3 Hz).

Exemplo de Síntese 3 (Preparação de 6-cloro-2-furfurilamino-4-fenilquinazolina (composto N° Ic3-16))

Uma mistura de 275 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (composto N° Ia1-3) e 486 mg de furfurilamina foi agitada a 85°C durante 40 minutos e em seguida vertida em 50 ml de água. A mistura foi extraída com acetato de etila e o extrato resultante foi lavado com água e em seguida concentrado. O resíduo resultante foi recristalizado a partir de etanol para

obter 280 mg do composto titulado. Mp.142,0°C. ^1H RMN (CDCl_3): 4,77 (2H, d, $J = 5,6$ Hz), 5,70 (1H, br. t, $J = 5,6$ Hz), 6,29-6,32 (2H, m), 7,36 (1H, dd, $J = 1,8, 0,9$ Hz), 7,53-7,70 (7H, m), 7,78 (1H, d, $J = 2,2$ Hz).

Exemplo de Síntese 4 (Preparação de 6-cloro-2-etoxicarbonilmetilamino-4-fenilquinazolina (composto N° Ic3-33))

Em 550 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (composto N° Ia1-3) e 419 mg de cloridrato de éster etílico de glicina foram adicionados 3 ml de DMF e 607 mg de trietilamina, seguido por agitação a 85°C durante 5,5 horas. A solução reacional resultante foi vertida em 100 ml de água e extraída com acetato de etila. O extrato foi concentrado. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel (hexano: acetato de etila = 6:1 a 3:1 para obter 503 mg do composto titulado. Mp.146,1°C. ^1H RMN (CDCl_3): 1,30 (3H, t, $J = 7,2$ Hz), 4,25 (2H, q, $J = 7,2$ Hz), 4,31 (2H, d, $J = 5,2$ Hz), 5,97 (1H, br. s), 7,54 – 7,63 (5H, m), 7,67 - 7,70 (2H, m), 7,79 (1H, s).

Exemplo de Síntese 5 (Preparação de 6-cloro-2-metoxiamino-4-fenilquinazolina (composto N° Ic3-32))

Em uma mistura de 275 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (composto N° Ia1-3), 10 ml de acetonitrilo e 334 mg de cloridrato de metoxiamina foi adicionado gota a gota 506 mg de trietilamina em temperatura ambiente para obter uma mistura. A mistura foi carregada em um vaso de reação resistente à pressão feito de aço inoxidável e a reação foi realizada a 105°C durante 3,5 horas. Depois de resfriar, a solução reacional foi vertida em 100 ml de água. A mistura foi extraída com acetato de etila e o extrato resultante foi lavado com água e em seguida concentrado. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel (hexano : acetato de etila = 3 : 1) para obter 156 mg de cristais crus. Os cristais crus foram recristalizados a partir de acetato de etila para obter 55 mg do composto titulado. Mp.173,9°C. ^1H RMN (CDCl_3): 3,98 (3H, s), 7,47-7,72 (6H, m), 7,87 (1H, d, $J = 9,0$ Hz), 7,89 (1H, d, $J = 2,2$ Hz), 8,03 (1H, br, s).

Exemplo de Síntese 6 (Preparação de 6-cloro-2-(2-hidroxietiltio)-4-fenilquinazolina (composto N° Ic3-1))

Em uma solução de 86 mg de 2-mercaptoetanol em DMF (7,5

ml) foi adicionado 44 mg de hidreto de sódio (60%), seguido por agitação em temperatura ambiente durante 30 minutos. À mistura de reação foi adicionado 275 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (composto N° Ia1-3), seguido por agitação em temperatura ambiente durante 2 horas. A solução reacional foi vertida em 100 ml de água e extraída com acetato de etila. O extrato resultante foi concentrado. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel (acetato de etila : hexano = 1 : 5) para obter 266 mg do composto titulado. Mp. 124,4°C. ¹H RMN (CDCl₃): 3,50 (2H, t, J = 5,5 Hz), 3,64 (1H, br. t), 4,07 (2H, q-semelhante, J = 5,5 Hz), 7,57-7,61 (3H, m), 7,71-7,74 (2H, m), 7,77 (1H, dd, J = 8,9, 2,3 Hz), 7,85 (1H, d, J = 8,9 Hz), 7,97 (1H, d, J = 2,3 Hz).

Exemplo de Síntese 7 (Preparação de 6-cloro-2-formamido-4-fenilquinazolina (composto N° Ic3-35))

Em uma solução de 54 mg de formamida seca em DMF (5 ml) foi adicionado 48 mg de hidreto de sódio (60%), seguido por agitação em temperatura ambiente durante 30 minutos. À mistura de reação foi adicionado 275 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (composto N° Ia1-3), seguido por aquecimento a 85°C e outra agitação durante 3 horas. A solução reacional resultante foi vertida em 100 ml de água e extraída com acetato de etila. O extrato foi concentrado. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel (acetato de etila : hexano = 1 : 3) para obter 64 mg do composto titulado. Mp. 252,1°C. ¹H RMN: 7,59-7,66 (3H, m), 7,72-7,81 (3H, m), 7,88 (1H, d, J = 8,8 Hz), 8,02 (1H, d, J = 2,0 Hz), 8,37 (1H, br. d, J = 10,4 Hz), 9,71 (1H, d, J = 10,4 Hz).

Exemplo de Síntese 8 (Preparação de 6-cloro-2-(1-metilidrazino)-4-fenilquinazolina (composto N° Ic3-27))

Uma mistura de 275 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (composto N° Ia1-3) e 461 mg de monometilidrazina foi agitada a 85°C durante 30 minutos. O produto de reação resultante foi resfriado e 200 ml de água foi adicionado a ele. Cristais precipitados foram coletados por filtração e o produto coletado foi purificado por cromatografia de coluna (acetato de etila) para obter 225 mg do composto titulado. Mp. 155,9°C. ¹H RMN (CDCl₃): 3,52

(3H, s), 4,65 (2H, s), 7,54-7,63 (5H, m), 7,70-7,74 (2H, m), 7,80 (1H, d, J = 2,0 Hz).

Exemplo de Síntese 9 (Preparação de 2-(2-aminoetóxi)-6-cloro-4-fenilquinazolina (composto N° Id3-1))

5 Da mesma maneira como no Exemplo de Síntese 6, 500 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (composto N° Ia1-3) e 382 mg de N-(2-hidroxietil)ftalimida foram reagidos para obter 380 mg de 6-cloro-4-fenil-2-(2-ftalimidoetóxi)quinazolina. Mp. 154,7°C. ¹H RMN (CDCl₃): 4,25 (2H, t, J = 5,8 Hz), 4,84 (2H, t, J = 5,8 Hz), 7,53-7,60 (3H, m), 7,67-7,71 (3H, m), 7,72-7,76
10 (3H, m), 7,78-7,82 (2H, m), 7,97 (1H, d, J = 2,2 Hz).

Uma mistura de 380 mg de 6-cloro-4-fenil-2-(2-ftalimidoetóxi)quinazolina, 70 mg de hidrato de hidrazina e 6 ml de etanol foi aquecida sob refluxo durante 2 horas. À solução reacional resultante foi adicionado 1,2 ml de água, e etanol foi em seguida destilado. Ao resíduo resul-
15 tante foi adicionado 1,5 ml de ácido clorídrico concentrado, seguido por aquecimento sob refluxo durante 1 hora. O produto de reação resultante foi resfriado e vertido em uma solução saturada de bicarbonato de sódio em água e extraído com acetato de etila. O extrato foi concentrado para obter 240 mg do composto titulado. Mp. 134,9°C. ¹H RMN (CDCl₃): 3,59-3,63 (2H,
20 m), 3,84 (2H, t, J = 4,6 Hz), 6,15 (2H, br. s), 7,53-7,59 (5H, m), 7,63-7,67 (2H, m), 7,75 (1H, d, J = 1,2 Hz).

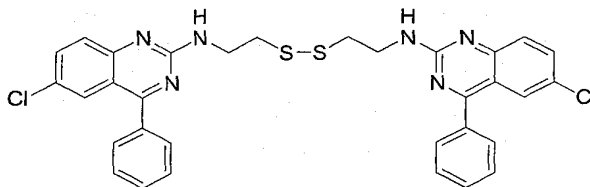
Exemplo de Síntese 10 (Preparação de 2-(2-acetiltioetilamino)-6-cloro-4-fenilquinazolina (composto N° Ic3-14))

25 Em uma solução de 292 mg de trifenilfosfina em THF desidratado (3 ml) foi adicionado gota a gota 563 mg de uma solução a 40% de diisopropilcarbodi-imida em tolueno sob resfriamento com gelo, seguido por agitação durante 20 minutos. À suspensão resultante foi adicionada gota a gota uma solução de 167 mg de 6-cloro-2-(2-hidroxietilamino)-4-fenilquinazolina (composto N° Ic3-1) em THF desidratado (2ml) sob resfria-
30 mento com gelo, e imediatamente 127 mg de ácido tioacético foi adicionado gota a gota. A solução amarelo-claro resultante foi agitada durante 1 hora sob resfriamento com gelo, agitada em temperatura ambiente durante 1 ho-

ra, vertida em uma solução saturada de bicarbonato de sódio em água, e em seguida extraída com clorofórmio. O extrato foi concentrado. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel (clorofórmio: acetato de etila = 10 : 1) para obter 170 mg do composto titulado. Mp. 128,9°C. ^1H RMN (CDCl_3): 2,34 (3H, s), 3,22 (2H, t, $J = 6,5$ Hz), 3,73 (2H, q, $J = 6,5$ Hz), 5,74 (1H, br. t, $J = 6,5$ Hz), 7,53-7,62 (5H, m), 7,65-7,70 (2H, m), 7,77 (1H, s).

Exemplo de Síntese 11 (6-cloro-2-(2-mercaptoetilamino)-4-fenilquinazolina (composto N° Ic3-13) e dissulfeto de bis[2-(6-cloro-4-fenil-2-quinazolinil)aminoetila] (composto N° Ic3-15))

Uma mistura de 108 mg de 2-(2-acetiltioetilamino)-6-cloro-4-fenilquinazolina (composto N° Ic3-14), 2 ml de etanol e 362 mg de uma solução de hidróxido de sódio aquosa a 10% foi agitada em temperatura ambiente durante 2 horas e agitada sob aquecimento sob refluxo durante 30 minutos. Em seguida substâncias insolúveis foram colecionadas por filtração a partir da solução reacional. O produto coletado (sólido) foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel (clorofórmio : acetato de etila = 10 : 1) para obter 50 mg de 6-cloro-2-(2-mercaptoetilamino)-4-fenilquinazolina, primeiro. Mp. 165,9°C. ^1H RMN (CDCl_3): 1,46 (1H, t, $J = 8,5$ Hz), 2,84 (2H, q-semelhante, $J=7,2$ Hz), 3,66 (2H, q-semelhante, $J=6,4$ Hz), 5,79 (1H, br. t, $J = 5,4$ Hz), 7,55-7,57 (3H, m), 7,60 (2H, s), 7,66-7,69 (2H, m), 7,77-7,78 (1H, m). Em seguida, 28 mg de dissulfeto de bis[2-(6-cloro-4-fenil-2-quinazolinil)aminoetil] (composto representado pela seguinte fórmula) foi obtido.



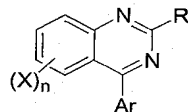
Mp. 159,2°C. ^1H RMN (CDCl_3): 3,02 (4H, t, $J=6,4$ Hz), 3,89 (4H, q, $J=6,4$ Hz), 5,81 (2H, br. t, $J=6,4$ Hz), 7,51-7,61 (10H, m), 7,63-7,68 (4H, m), 7,75 (2H, d, $J = 2,2\text{Hz}$).

Exemplos de compostos que podem ser preparados da mesma maneira como nos Exemplos de Síntese descritos acima e compostos co-

mercialmente disponíveis são mostrados na Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6 (da mesma forma incluindo os compostos preparados nos Exemplos de Síntese descritos acima).

Notas "a)", "b)", "c)" e "d)" na Tabela 4 e Tabela 5 são como segue.

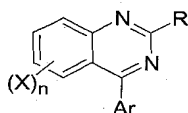
5 Tabela 3



Composto Nº	R	Ar	(X) _n	Ponto de fusão (°C)
Ia1-1	Cl	Ph	5-Cl	125,7
Ia1-2	Cl	Ph	6-F	131,9
Ia1-3	Cl	Ph	6-Cl	166,2
Ia1-4	Cl	Ph	6-Br	185,1 (decomposição)
Ia1-5	Cl	Ph	6-Me	137,8
Ia1-6	Cl	Ph	6-CF ₃	117,5 (decomposição)
Ia1-7	Cl	Ph	6-NO ₂	242,5 (decomposição)
Ia1-8	Cl	Ph	6-OMe	148,6
Ia1-9	Cl	Ph	6-CN	206,8 (decomposição)
Ia1-10	Cl	Ph	7-Cl	115,4
Ia1-11	Cl	Ph	8-Cl	154,4
Ia1-12	Cl	Ph	6,8-Cl ₂	160,3
Ia1-13	Cl	p-Cl-Ph	6-Cl	205,6
Ia1-14	Cl	m-Cl-Ph	6-Cl	161,3
Ib4-1	CHO	o-Cl-Ph	6-Br	
Ic0-1	NH(CH ₂) ₂ OH	Ph	(n=0)	
IC1-1	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	5-Cl	175,7
Ic2-1	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	6-F	99,3
Ic3-1	NH(CH ₂) ₂ OH	Ph	6-Cl	137,9

Ic3-2	pirrolidino	Ph	6-Cl	
Ic3-3	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	6-Cl	135,9
Ic3-4	NH(CH ₂) ₄ OH	Ph	6-Cl	115,6
Ic3-5	NH(CH ₂) ₅ OH	Ph	6-Cl	117,2
Ic3-6	NMe(CH ₂) ₂ OH	Ph	6-Cl	128,5
Ic3-7	NH(CH ₂) ₂ OMe	Ph	6-Cl	89,7
Ic3-8	NHn-Pr	Ph	6-Cl	158,3
Ic3-9	NMe(CH ₂) ₂ O Me	Ph	6-Cl	88,5

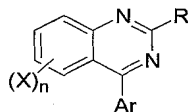
Tabela 4



Composto Nº	R	Ar	(X) _n	Ponto de fusão (°C)
Ic3-10	NH(CH ₂) ₂ CHMe ₂	Ph	6-Cl	90,1
Ic3-11	NH(CH ₂) ₆ OH	Ph	6-Cl	107,9
Ic3-12	NH(CH ₂) ₂ CH(Me)CH ₂ OH	Ph	6-Cl	112,7
Ic3-13	NH(CH ₂) ₂ SH	Ph	6-Cl	165,9
Ic3-14	NH(CH ₂) ₂ SAc	Ph	6-Cl	128,9
Ic3-15	a)			159,2
Ic3-16	Nhfurfurila	Ph	6-Cl	142,0
Ic3-17	NHCH ₂ CH=CMe ₂	Ph	6-Cl	95,9
Ic3-18	NHCH ₂ CH=C(Me)CH ₂ OH	Ph	6-Cl	154,8
Ic3-19	NH ₂	Ph	6-Cl	157,8
Ic3-20	NHNH ₂	Ph	6-Cl	175,0
Ic3-21	NH(CH ₂) ₂ NMe ₂	Ph	6-Cl	102,1
Ic3-22	NH(CH ₂) ₄ NH ₂	Ph	6-Cl	118,0
Ic3-23	NHMe	Ph	6-Cl	186,9
Ic3-24	NHEt	Ph	6-Cl	156,7
Ic3-25	NMe ₂	Ph	6-Cl	141,8

Ic3-26	NHCH ₂ CN	Ph	6-Cl	208,6 (decomposição)
Ic3-27	NMeNH ₂	Ph	6-Cl	155,9
Ic3-28	NHi-Pr	Ph	6-Cl	112,5
Ic3-29	NHCH ₂ CH=CH ₂	Ph	6-Cl	147,3
Ic3-30	NHCH ₂ C≡CH	Ph	6-Cl	168,4
Ic3-31	NHCH ₂ CONH ₂	Ph	6-Cl	140,3
Ic3-32	NHOMe	Ph	6-Cl	173,9
Ic3-33	NHCH ₂ CO ₂ Et	Ph	6-Cl	146,1
Ic3-34	NHCH ₂ CH ₂ CN	Ph	6-Cl	198,7
Ic3-35	NHCHO	Ph	6-Cl	252,1
Ic3-36	guanidina	Ph	6-Cl	253,4 (decomposição)

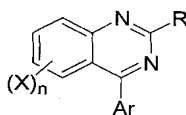
Tabela 5



Composto Nº	R	Ar	(X) _n	Ponto de fusão (°C)
Ic3-37	NHtetra-hidrofurfurila	Ph	6-Cl	xarope, b)
Ic3-38	NH(CH ₂) ₃ OMe	Ph	6-Cl	89,1
Ic3-39	NHCH ₂ CH(OH)CH ₃	Ph	6-Cl	154,2
Ic3-40	NH(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ OH	Ph	6-Cl	117,4
Ic3-41	NHCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	Ph	6-Cl	147,0
Ic3-42	NHCH ₂ CO ₂ Me	Ph	6-Cl	190,5
Ic3-43	NHCH ₂ CH ₂ CO ₂ Me	Ph	6-Cl	117,1
Ic3-44	NHCH(Me)CH ₂ OH	Ph	6-Cl	52,8
Ic3-45	NHCH ₂ CH ₂ OEt	Ph	6-Cl	xarope, c)
Ic3-46	NH(CH ₂) ₃ OEt	Ph	6-Cl	xarope, d)
Ic4-1	NH(CH ₂) ₂ OH	Ph	6-Br	
Ic4-2	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	6-Br	140,9

Ic4-3	NHCH ₂ CO ₂ Me	Ph	6-Br	183,1 (decomposição)
Ic5-1	NH-p-Cl-Ph	Ph	6-Me	
Ic5-2	NHCH ₂ CONH ₂	Ph	6-Me	
Ic5-3	NHCH ₂ CO ₂ Et	Ph	6-Me	
Ic5-4	NH ₂	Ph	6-Me	151,8
Ic5-5	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	6-Me	121,1
IC6-1	NH ₂	Ph	6-CF ₃	160,4
IC6-2	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	6-CF ₃	135,1
Ic7-1	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	6-NO ₂	177,4
Ic8-1	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	6-OMe	115,9
Ic9-1	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	6-CN	173,3 (decomposição)
IC10-1	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	7-Cl	129,7

Tabela 6



Composto Nº	R	Ar	(X) _n	Ponto de fusão (°C)
IC11-1	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	8-Cl	115,5
IC12-1	NH(CH ₂) ₃ OH	Ph	6,8-Cl ₂	146,2
IC12-2	NHCH ₂ CH ₂ OH	Ph	6,8-Cl ₂	168,8
IC12-3	Nhfurfurila	Ph	6,8-Cl ₂	158,6
IC12-4	NH ₂	Ph	6,8-Cl ₂	212,7
IC12-5	NHCH ₂ CN	Ph	6,8-Cl ₂	204,7
IC12-6	NHCH ₂ CO ₂ Me	Ph	6,8-Cl ₂	201,4
Id3-1	O(CH ₂) ₂ NH ₂	Ph	6-Cl	134,9
Ie3-1	S(CH ₂) ₂ OH	Ph	6-Cl	124,4
Ie3-2	S(CH ₂) ₂ NH ₂	Ph	6-Cl	88,3

a) A estrutura foi descrita no Exemplo de Síntese 11.

b) ^1H RMN (CDCl_3): 1,66-1,75 (1H, m), 1,86-2,08 (3H, m), 3,57-3,64 (1H, m), 3,75-3,83 (2H, m), 3,89-3,59 (1H, m), 4,13-4,20 (1H, m), 5,70 (1H, br. s), 7,52-7,60 (5H, m), 7,64-7,69 (2H, m), 7,75-7,76 (1H, m).

5 c) ^1H RMN (CDCl_3): 1,22 (3H, t, $J = 7,0$ Hz), 3,55 (2H, q, $J = 7,0$ Hz), 3,68 (2H, t, $J = 5,2$ Hz), 3,78 (2H, q-semelhante, $J = 5,2$ Hz), 5,75 (1H, br. t), 7,53-7,60 (5H, m), 7,65-7,69 (2H, m), 7,75-7,77 (1H, m).

d) ^1H RMN (CDCl_3): 1,22 (3H, t, $J = 7,0$ Hz), 1,96 (2H, quinteto, $J = 6,3$ Hz), 3,50 (2H, q, $J = 7,0$ Hz), 3,58 (2H, t, $J = 6,3$ Hz), 3,67 (2H, q-semelhante, $J = 6,3$ Hz), 5,65 (1H, br. t), 7,53-7,60 (5H, m), 7,65-7,69 (2H, m), 7,74-7,76 (1H, m).

Exemplo de Síntese de Referência 1 (Preparação de 8-cloro-4-fenil-2(1H)-quinazolinona (composto N° II-11))

Em 7,10 g de brometo de fenilmagnésio (solução de THF a 32%) foi adicionada gota a gota uma solução de 953 mg de 2-amino-3-clorobenzonitrilo em THF (7 ml) em temperatura ambiente, seguido por aquecimento sob refluxo durante 30 minutos. Ao produto de reação resultante foi adicionado gota a gota 885 mg de clorocarbonato de metila sob resfriamento com gelo, seguido por aquecimento sob refluxo durante 40 minutos. A solução reacional resultante foi resfriada e vertida em 40 ml de ácido 2N-clorídrico, e 8 g de bicarbonato de sódio e 20 ml de MTBE foram adicionados a ela, seguido por agitação. Cristais precipitados foram coletados por filtração para obter 1,30 g do composto titulado. ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$): 7,24(1H, t, $J = 8,0$ Hz), 7,57-7,70 (6H, m), 7,90-7,93 (1H, m), 11,45 (br. s).

Exemplo de Síntese de Referência 2 (4-fenil-6-trifluorometil-2(1H)-quinazolinona (composto N° II-6))

Em uma solução de 762 mg de 2-amino-5-trifluorometilbenzeno-
fenona em 10 ml de clorofórmio foi adicionado gota a gota 349 mg de trietilamina, e em seguida 627 mg de cloreto de tricloroacetila foram adicionados gota a gota sob resfriamento com gelo. Depois de agitar na mesma temperatura durante 30 minutos, 50 ml de água foi adicionado, desse modo separando a solução. A camada orgânica foi coletada e em seguida concentrada. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel

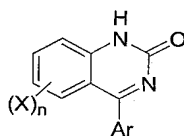
(hexano : acetato de etila = 5 : 1) para obter 1,08 g de 2'-benzoil-2,2,2-tricloro-4'-trifluorometilacetanilida. ^1H RMN (CDCl_3): 7,53-7,58 (2H, m), 7,66-7,75 (3H, m), 7,90-7,95 (2H, m), 8,81 (1H, d, $J = 8,6$ Hz), 12,38 (1H, br. s).

- 5 Uma mistura de 1,08 g de 2'-benzoil-2,2,2-tricloro-4'-trifluorometilacetanilida, 10 ml de DMSO e 1,18 g de acetato de amônio foi agitado a 75°C durante 1 hora. Depois de resfriar, 100 ml de água foi adicionado e cristais precipitados foram coletados por filtração. A substância coletada resultante foi dissolvida em uma mistura de hexano: acetato de etila = 1:1, desidratado utilizando sulfato de magnésio anidro e em seguida concentrado para obter 765 mg do composto titulado. ^1H RMN (CDCl_3): 7,58-7,68 (3H, m), 7,75 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), 7,79-7,83 (2H, m), 7,93 (1H, dd, $J = 8,8, 1,7$ Hz), 8,17 (1H, br. s), 13,37 (1H, br. s).
- 10

- Exemplos de compostos que podem ser preparados da mesma maneira como nos Exemplos de Síntese de Referência descritos acima na
- 15 Tabela 7 (da mesma forma incluindo os compostos preparados nos Exemplos de Síntese de Referência descritos acima).

Notas "a)" a "i)" na Tabela 7 são como segue.

Tabela 7



Composto Nº	Ar	(X) _n	Ponto de fusão (°C)
II-1	Ph	5-Cl	a)
II-2	Ph	6-F	b)
II-3	Ph	6-Cl	>300
II-4	Ph	6-Br	c)
II-5	Ph	6-Me	291,9
II-6	Ph	6-CF ₃	d)
II-7	Ph	6-NO ₂	280(decomposição)
II-8	Ph	6-OMe	e)
II-9	Ph	6-CN	f)

II-10	Ph	7-Cl	g)
II-11	Ph	8-Cl	h)
II-12	Ph	6,8-Cl ₂	i)
II-13	p-Cl-Ph	6-Cl	269,6(decomposição)
II-14	m-Cl-Ph	6-Cl	295(decomposição)

a) ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,27 (1H, dd, J = 7,7, 1,0 Hz), 7,38 (1H, dd, J = 8,3, 1,1 Hz), 7,43-7,55 (5H, m), 7,69 (1H, t, J = 8,1 Hz), 12,18 (1H, br. s).

b) ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,35 (1H, dd, J = 9,2, 2,7 Hz), 7,43 (1H, dd, J = 9,2, 4,8 Hz), 7,58-7,74 (6H, m), 12,05 (1H, br. s).

5 c) ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,35 (1H, d, J = 9,2 Hz), 7,59-7,71 (6H, m), 7,91 (1H, dd, J = 9,2, 2,2 Hz), 12,08 (1H, br. s).

d) ¹H RMN descrito no Exemplo de Síntese de Referência 2

e) ¹H RMN (CDCl₃): 3,78 (3H, s), 7,25-7,27 (1H, m), 7,36-7,40 (1H, m), 7,54-7,62 (4H, m), 7,81-7,85 (2H, m), 13,37 (1H, br. s).

10 f) ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,48 (1H, d, J = 8,4 Hz), 7,60-7,68 (3H, m), 7,71-7,74 (2H, m), 8,05 (1H, s), 8,08-8,12 (1H, m), 12,36 (1H, br. s).

g) (não isolado e purificado)

h) ¹H RMN descrito no Exemplo de Síntese de Referência 1

15 i) ¹H RMN (DMSO-d₆): 7,52-7,72 (6H, m), 8,10-8,12 (1H, m), 11,69 (1H, br. s).

Exemplo 1 (Construção de biblioteca de fago de cDNA de *Arabidopsis thaliana* para clonar CER1)

Sementes de *Arabidopsis thaliana*, linhagem de Wassilewskija foram esterilizadas com álcool etílico a 70% durante um minuto e em seguida com 1,5% de hipoclorito de sódio durante 10 minutos. As sementes foram bem lavadas com água estéril e em seguida cultivadas em um meio de GM (4,3 mistura salgada basal de Murashige e Skoog's, 1% de sacarose, 10 ml de 5% de MES-KOH (pH 5,7), 0,3% de Phitagel® (SIGMA)) durante 2 semanas para obter 5 g de uma planta. A planta foi congelada em nitrogênio líquido e em seguida fisicamente moída com um alfamotriz. Ao produto moído

20

25 obtido foi adicionado uma mistura de 10 mg de tampão de extração (200mM

de Tris-HCl (pH 8,5), 100mM de NaCl, 10mM de EDTA, 0,5% de SDS, 14mM de β -mercaptoetanol) e 10 g de fenol. A mistura foi agitada por um misturador de Voltex. Em seguida, 10 ml de clorofórmio foi adicionado à mistura, seguido por agitação completa. Logo, a mistura obtida foi centrifugada em 10.000 rpm durante 20 minutos, e uma camada aquosa foi coletada. À camada aquosa coletada foi adicionado LiCl em uma concentração final de 2M, seguida por repouso a -80°C durante 3 horas. O produto congelado obtido foi descongelado e em seguida centrifugado a 10.000 rpm durante 20 minutos. Um precipitado foi coletado. O precipitado coletado foi dissolvido em 2 ml de TE (10mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1mM de EDTA). Depois que 0,2 ml de 3M de acetato de sódio (pH 5,2) e 5 ml de etanol foram adicionados à solução, a mistura foi centrifugada para coletar um precipitado de RNA. Logo, RNA contendo poliA foi extraído a partir do precipitado coletado (RNA) com Oligotex® dT30super (fabricado por Roche Japan Co., Ltd.).

Uma biblioteca de cDNA de fase foi construída a partir do RNA extraído contendo poliA utilizando-se *Kit* de ZAP-cDNASynthesis (fabricado por Stratagene Co., Ltd.) de acordo com a instrução do *kit*. O título da biblioteca de cDNA de fago construída foi 500.000 PFU.

Exemplo 2 (Preparação de sonda de DNA para CRE1)

Reação de PCR foi realizada utilizando-se um líquido de fago (cerca de 1.000.000 PFU) da biblioteca de cDNA de fago preparada no Exemplo 1 como um modelo e um DNA de SEQ ID NO:3 e um DNA de SEQ ID NO:4 como iniciadores, utilizando *kit* TAKARA LA Taq® (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.) para ampliar um DNA. Detalhes são descritos abaixo.

Um líquido de reação de PCR foi preparado adicionando-se composições de reação tal como dNTP a 1.000.000 de PFU da fase e cada 0,2 μ M de DNAs de iniciador de acordo com a instrução do *kit*. PCR foi realizada sob as condições que depois de manter quente a 94°C durante 2 minutos, 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos e a 68°C durante 5 minutos foram conduzidos, para ampliar o fragmento de DNA desejado. Logo, uma sonda rotulada com 32 P foi preparada utilizando-

se o fragmento de DNA ampliado como um modelo e utilizando-se o *kit* de sistema de rotulagem de DNA Megaprime (fabricado por Amersham Pharmacia). Aqui, um líquido de reação (25 µl) foi preparado adicionando-se 32PdCTP 2,0 MBq a 25 ng do fragmento de DNA ampliado e em seguida
5 adicionando composições de reação especificadas pelo equipamento a este. Reação de rotulagem foi realizada a 37°C durante 10 minutos.

Exemplo 3 (Obtenção de Clone de cDNA de Fago transportando Gene de CRE1)

O gene de DRE1 desejado foi clonado por hibridização de placa
10 utilizando a sonda de DNA preparada no Exemplo 2. Detalhes são descritos abaixo.

Placas foram formadas utilizando-se a biblioteca de fago de cDNA preparada no Exemplo 1 de acordo com as instruções de *kit* ZAP-cDNARSynthesis. DNAs foram absorvidos em um filtro de nitrocelulose das
15 placas formadas, e em seguida fixados sobre o filtro por um tratamento ultravioleta. O filtro desse modo preparado foi mantido a 65°C na presença de 6 x SSC (0,9M de NaCl, 0,09M de citrato de sódio), 5 x solução de Denhart (0,1% (p/v) de Ficol 400, 0,1% (p/v) de polivinil pirrolidona, 0,1% de BSA), 0,5% (p/v) de SDS, e 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado
20 ou em uma solução de DIG EASY Hyb (Boehringer Mannheim Co., Ltd.) contendo 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado, mantido duas vezes em temperatura ambiente durante 15 minutos na presença de 1 x SSC (0,15M de NaCl, 0,015M de citrato de sódio) e 0,5% de SDS, e em seguida mantido a 68°C durante 30 minutos na presença de 0,1 x SSC
25 (0,015M de NaCl, 0,0015M de citrato de sódio) e 0,5% de SDS para obter um clone de cDNA de fago cruzado.

Exemplo 4 (Clone de cDNA de CRE1)

Reação de PCR foi realizada utilizando-se cDNA do clone de cDNA de fago obtido no Exemplo 3 como um modelo e utilizando-se um
30 DNA de SEQ ID NO:5 e um DNA de SEQ ID NO:6 como iniciadores para ampliar um DNA tendo a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:5. Detalhes são descritos abaixo.

A reação de PCR foi realizada utilizando-se DNA Polimerase Realçado por Herculase (fabricado por TOYOBO Co., Ltd.) sob a condição de amplificação que depois de manter quente a 94°C durante 1 minuto, 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos e a 72°C durante 4 minutos foram conduzidos. Aqui, um líquido de reação de PCR (50 μ l) foi preparado adicionando-se composições de reação tal como dNTP a 500 ng de cDNA do clone de cDNA de fago e cada 100 ng de DNAs de iniciador de acordo com a instrução do *kit*.

Como descrito acima, o fragmento de DNA desejado foi ampliado.

Exemplo 5 (Construção de plasmídeo de expressão de CRE1)

Um vetor de expressão de levedura, p415CYC (Munberg e outros. Gene: 156 119-122 (1995), disponível a partir de biblioteca de ATCC (No. 87382)) foi digerido com a enzima de restrição Sma I. Em seguida, o fragmento de DNA obtido no Exemplo 4 (um DNA tendo a sequência de nucleotídeo SEQ ID NO:2) foi conectado a uma sequência de promotor CYC1 do vetor de expressão p415CYC1 utilizando-se T4 DNA Ligase, e desse modo incorporado de forma que a proteína desejada poderia ser expressada em levedura. Foi confirmado que a sequência de nucleotídeo do fragmento de DNA foi inserido na direção correta e foi uma sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2 utilizando-se um sequenciador. Desse modo, o plasmídeo de expressão p415CYC-CRE1 foi obtido.

Exemplo 6 (Produção de célula transformada TM182-CRE1 e célula transformada TM182-p415CYC1)

Cada um dos plasmídeos de expressão p415CYC-CRE1 obtidos no Exemplo 5 e o vetor de expressão de levedura p415CYC foi usado para transformar uma cepa deficiente de gene Sln1, TM182 (*sln1* Δ) (Maeda T e outros. Nature: 369 242-245 (1994)). A transformação foi realizada utilizando-se um método de transformação mediado por acetato de Polietileno glicol / lítio (PEG/LiAc) de acordo com VII. Transformation & Screening Protocols described in CLONTECH Co., Ltd.: MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 User Manual, page 22. Visto que uma exigência nutricional de leucina desa-

parece na célula transformada obtida, leveduras transformadas capazes de crescer em um meio de DOLU + Gal foram selecionadas para obter a célula transformada TM182-CRE1 e a célula transformada TM182-p415CYC1.

Exemplo 7 (Método para avaliar substância química capaz de inibir a sinalização intracelular de receptor de citocinina derivado da planta de célula)

5 A célula transformada TM182-CRE1 e a célula transformada TM182-p415CYC1 obtida no Exemplo 6 foram cada qual inoculadas em 10 ml de um meio DOLU + Gal, e pré-incubadas a 30°C durante 18 horas para obter uma pré-incubação líquida para cada uma das células transformadas.

10 O líquido de pré-incubação foi diluído com um meio de DOLU + Glu para a célula transformada TM182-CRE1 ou com um meio de DOLU + Gal para a célula transformada TM182-p415CYC1 até OD600 = 0,1 foi alcançado, para obter uma diluição de pré-incubação por cada uma das células transformadas.

15 A cada cavidade de uma placa de 96 cavidades foi adicionado 1 µl de uma solução de 200 ppm de uma substância teste em dimetil sulfóxido (DMSO) para preparar uma placa de Ensaio. Ao mesmo tempo, como controles, apenas 1 µl de DMSO foi adicionado a uma parte das cavidades. Uma placa de ensaio para a célula transformada TM182-CRE1 e uma placa

20 de ensaio para a célula transformada TM182-p415CYC1 foram preparadas.

Uma solução de 10.000 ppm de trans-zeatina (citocinina) em DMSO foi diluída 50 vezes com um meio de DOLU + Gul em 200 ppm. A solução de trans-zeatina de 200 ppm foi adicionada em uma quantidade de 3/1.000 de volume a cada uma da diluição de pré-incubação descrita acima

25 para preparar cada diluição de pré-incubação contendo trans-zeatina a 0,6 ppm. A diluição de pré-incubação de 0,6 ppm foi adicionada em uma quantidade de 100 µl a cada uma das cavidades da placa de ensaio para cada célula transformada. As placas foram incubadas a 30°C durante 24 horas. Em seguida, a turvação (OD 600) de cada cavidade foi medida utilizando-se uma

30 leitora de placa. A atividade da substância teste para inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula foi testada comparando-se a turvação medida com a turvação da cavidade de

controle. Resultados são mostrados nas Tabelas 8 e 9.

- Para a célula transformada TM182-CRE1, uma substância teste que teve uma turvação mais baixa do que a turvação da cavidade de controle foi selecionada como uma substância química capaz de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula. Para a célula transformada TM182-p415CYC1, entretanto, uma substância teste que teve uma turvação mais baixa do que a turvação da cavidade de controle em que o grau de redução é equivalente a ou maior do que no caso da célula transformada TM182-CRE1 fosse tóxica a levedura, e portanto não foi selecionada como uma substância química capaz de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula.

(Taxa de crescimento relativa na seção teste para seção de controle)

$$[\%] = \frac{[(\text{Turvação na seção de teste}) - (\text{Turvação em absoluto})]}{[(\text{Turvação na seção de controle}) - (\text{Turvação em absoluto})]} \times 100$$

(Atividade de inibir a sinalização intracelular de receptor de citocinina derivado da planta de célula) $[\%] = 100 - (\text{Taxa de crescimento relativa na seção teste para seção de controle})$

Tabela 8

Substância química (composto N°)	Taxa de crescimento relativa (%) na seção teste de substância teste para seção de controle		(% de Atividade de substância teste para inibir a sinalização intracelular de receptor de citocinina derivado da planta de célula
	Célula transformada TM182-CRE1	Célula transformada TM182-p415CYC1	
la1-3	5,5	113,9	94,5
la1-7	1,2	78,8	98,8
lb4-1	8,7	110,9	91,3
lC11-1	2,2	114,5	97,8
lC12-1	2,8	106,3	97,2
lc2-1	2,8	124,6	97,2
lC3-1	5,4	114,1	94,6
lc3-3	1,4	108,6	98,6
lc3-4	1,4	106,4	98,6

lc3-5	3,5	115,4	96,5
lc3-6	2,8	114,6	97,2
lc3-7	2,8	104,1	97,2
lc3-9	1,5	122,0	98,5
lc3-11	3,9	84,6	96,1
lc3-12	5,6	90,9	94,4
lc3-16	3,2	97,0	96,8
lc3-18	4,0	105,3	96,0
lc3-19	2,4	102,7	97,6
lc3-20	5,0	86,5	95,0
lc3-21	5,0	121,6	95,0
lc3-22	4,9	110,6	95,1
lc3-23	4,1	108,1	95,9
lc3-24	2,1	112,5	97,9
lc3-25	6,0	122,0	94,0
lc3-26	5,3	110,7	94,7
lc3-27	2,3	107,4	97,7
lc3-29	1,6	92,7	98,4

Em todos os casos, a concentração existente de trans-zeatina foi ajustada em 0,6 ppm e a concentração existente de uma substância química foi ajustada em 2 ppm.

Tabela 9

Substância química (composto N°)	Taxa de crescimento relativa (%) na seção teste de substância teste para seção de controle		(%) de Atividade de substância teste por inibir a sinalização intracelular de receptor de citocinina derivado da planta de célula
	Célula trans-formada TM182-CRE1	Célula transfor-mada TM182-p415CYC1	
lc3-30	2,2	108,9	97,8
lc3-32	4,5	89,2	95,5
lc3-33	1,0	114,6	99,0
lc3-34	0,2	118,5	99,8
lc3-37	3,5	114,2	96,5

lc3-38	1,2	99,4	98,8
lc3-39	-1,3	108,1	101,3
lc3-40	0,7	123,4	99,3
lc3-41	8,8	123,3	91,2
lc3-42	-0,7	111,5	100,7
lc3-43	0,8	122,0	99,2
lc3-44	7,0	101,4	93,0
lc3-45	0,8	98,7	99,2
lc3-46	1,3	92,2	98,7
lc4-1	4,6	95,0	95,4
lc4-2	0,9	109,3	99,1
lc5-4	8,9	116,8	91,1
lc5-5	7,2	126,3	92,8
lc7-1	6,7	115,8	93,3
ld3-1	2,1	112,5	97,9
le3-1	2,3	110,7	97,7

Em todos os casos, a concentração existente de trans-zeatina foi ajustada em 0,6 ppm e a concentração existente de uma substância química foi ajustada em 2 ppm.

- Exemplo 8 (Método para testar resposta à dose da substância química capaz de inibir a sinalização intracelular de receptor de citocinina derivado da planta de célula)

As substâncias químicas (que inibem sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula) selecionadas no Exemplo 7 foram testadas em concentrações de teste variadas da mesma maneira como no Exemplo 7. A célula transformada TM182-CRE1 e a célula transformada TM182-p415CYC1 obtidas no Exemplo 6 foram incubadas sob as mesmas condições como no Exemplo 7 a não ser que as concentrações de teste das substâncias químicas (que inibem sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula) selecionadas no Exemplo 7 foram variadas dentro da faixa de 0,06 ppm a 6 ppm. A concentração da substância química testada foi ajustada com DMSO. Depois da

conclusão de incubação, resposta à dose para atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula foi examinada a partir da concentração de teste mínima em que um estado proliferativo da célula transformada TM182-CRE1 não foi observado, ou de uma curva de inibição de crescimento de resposta à dose obtida por um método como descrito abaixo.

Para preparar uma curva de inibição de crescimento de resposta à dose, primeiro, uma taxa de crescimento relativa foi calculada como segue.

(Taxa de crescimento relativa) [%] = (B)/(A) × 100

(A) = [(Turvação em 0,06 ppm de seção de teste) - (Turvação em absoluto)] / [(Turvação na seção de controle) - (Turvação em absoluto)]

(B) = [(Turvação em cada seção de teste) - (Turvação em absoluto)] / [(Turvação na seção de controle) - (Turvação em absoluto)]

Em seguida, um gráfico em que o eixo X mostrou a concentração de uma substância química de teste e o eixo de Y mostrou uma taxa de crescimento relativa (vide Figura 1, figuras da esquerda: célula transformada TM182-CRE1, figuras da direita: célula transformada TM182-p415CYC1) foi feita para obter uma curva de inibição de crescimento de resposta à dose.

Exemplo 9 (Teste de Atividade de Promoção de Crescimento de Raiz)

Meio padrão de Enshi tendo a seguinte composição (vide Tabela 10) foi preparado. Aos tubos em grupo foi distribuído a cada, 4 µl de uma solução de uma substância química em DMSO em uma concentração final 0,001 ppm a 10 ppm, e em seguida, foi distribuído a cada 600 µl do meio padrão de Enshi esterilizado. Em seguida a solução resultante foi bem misturada. Em cada um dos tubos em grupo, 10-20 sementes de *Arabidopsis thaliana* foram semeadas, e cultivadas a 22°C durante 10 dias na luz. Em seguida, o comprimento de raízes principais (raízes principais médias) geradas a partir das sementes de *Arabidopsis thaliana* foi medido. Uma média de oito repetições foi determinada, e uma taxa de crescimento de raiz foi determinada de acordo com a seguinte equação. Como um resultado, uma substância química que exibiu uma taxa de crescimento de raiz significativa (por exemplo, uma taxa de crescimento de raiz de 120% ou mais) poderia ser julgada

ter uma atividade de promoção de crescimento de raiz.

Como resultados detalhados, concentrações finais que exibiram as taxas de crescimento de raiz mais altas foram mostradas na Tabela 11 e Tabela 12.

- 5 Taxa de crescimento de raiz (%) = (comprimento de raiz principal média na seção tratada por substância química) / (comprimento de raiz principal média na seção de controle) × 100

Tabela 10

Composição		Concentração (mg/L)
Nitrato de cálcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	950
Nitrato de potássio	KNO_3	810
Sulfato de magnésio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500
Fosfato de amônio	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	155
Ferro quelado	Fe-EDTA	22,62
Ácido bórico	H_3BO_3	2,86
Sulfato de manganês	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81
Sulfato de zinco	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08
Molibdato de sódio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025
Ajustado em pH 5,8		

Tabela 11

Composto Nº	Concentração final de teste (ppm)	Atividade de promoção de crescimento de raiz
Ic3-3	5	163,4
Ic3-4	0,625	129,5
Ic3-5	0,625	134,0
Ic3-6	0,625	122,4
Ic3-7	1,25	142,5
Ic3-8	1,25	136,4
Ia1-3	5	137,5

le3-1	5	120,9
le3-2	10	147,6
lc3-10	10	120,6
lc3-11	1,25	128,2
lc3-12	1,25	128,9
lc3-13	10	140,5
lc3-14	2,5	126,2
lc3-15	5	131,0
lc3-16	5	155,3
lc3-17	10	121,3
lc3-18	2,5	139,5
lc3-19	1,25	155,6
lc3-20	10	137,8
lc3-21	2,5	131,7
lc3-22	0,156	129,3
lc3-23	10	150,0
lc3-24	1,25	122,8
lc3-25	10	140,0
lc3-26	5	136,4
lc3-27	2,5	127,8
lc5-4	2,5	136,6
lc5-5	2,5	157,8
lc3-28	10	120,4
lc3-29	10	122,4
lc3-31	10	142,2
lc3-32	5	123,4
lc3-33	5	123,9

Tabela 12

Composto Nº	Concentração final de teste (ppm)	Atividade de promoção de cresci- mento de raiz
Ic3-35	10	144,4
Ic3-36	2,5	123,1
Ia1-1	5	133,3
Ia1-2	10	139,7
Ic2-1	2,5	127,4
Ic9-1	10	141,5
IC1-1	2,5	150,9
IC10-1	10	163,6
IC11-1	5	143,9
IC12-1	2,5	184,6
IC6-2	2,5	155,9
Ia1-6	0,625	126,9
Ic8-1	10	162,1
Ic3-37	5	138,5
Ic3-38	5	141,9
Ic3-39	10	169,0
Ic3-40	0,625	125,8
Ic3-41	5	134,5
Ic3-42	0,625	128,6
Ic3-43	2,5	137,9
Ic3-44	1,25	126,5
Ic3-46	2,5	121,6
IC12-3	2,5	138,8
Ia1-14	0,156	129,3
II-5	10	124,4
II-7	5	124,4
II-14	2,5	126,1

Exemplo 10 (Avaliação utilizando alface de atividade de promoção de crescimento de raiz de substância capaz de inibir a sinalização de citocinina)

Com respeito à substância química lc3-1 e a substância química lc7-1 (que inibem sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula) selecionada no Exemplo 7, uma atividade de promoção de crescimento de raiz principal foi avaliada utilizando alface (*Lactuca sativa* Red wave). Soluções aquosas da substância química tendo concentrações diferentes (0,6 ppm, 1,2 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, cada contendo 0,1% de DMSO) foram preparadas, e adicionadas em uma quantidade de 1 ml sobre um papel filtro tendo um diâmetro de 50 mm em uma placa de Petri plástica de 60 ϕ . Em seguida, 30 sementes de alface foram semeadas na placa de Petri plástica. Depois da cultura na luz a 22°C durante 4 dias, o comprimento de uma raiz principal foi medido. Uma média de 3 repetições foi determinada em uma taxa de crescimento de raiz foi determinada pela seguinte equação.

$$\text{Taxa de crescimento de raiz (\%)} = (\text{comprimento de raiz principal médio na seção tratada por substância química}) / (\text{comprimento de raiz principal médio na seção de controle}) \times 100 - 100$$

Resultados são mostrados na Figura 2 e Figura 3. No caso da substância química lc3-1, o crescimento de raiz principal a 0,6 ppm para 2,5 ppm foi aumentado por 15 a 17% relativo a seção de controle (vide Figura 2). No caso da substância química lc7-1, a extensão de raiz principal em 10 ppm a 20 ppm foi aumentada por 10 a 17% relativo a seção de controle (vide Figura 3). Resultados do teste de Dunnett mostraram que houve diferença significativa em um nível significativo de 5% em todas as seções de tratamento, e portanto, houve efeito de promoção de crescimento de raiz notável.

Exemplo 11 (Avaliação utilizando arroz de atividade de promoção de crescimento de raiz de substância capaz de inibir a sinalização de citocinina)

Com respeito à substância química lc3-1 e a substância química lc7-1 (que inibem sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula) selecionada no Exemplo 7, uma atividade de promoção de crescimento de raiz foi avaliada utilizando arroz (*Oriza sativa* L

japonica.). Soluções aquosas da substância química tendo concentrações diferentes (10 ppm, 25 ppm, cada qual contendo 0,1% de DMSO) foram preparadas. Uma toalha de papel foi impregnada com 17 ml da solução química, em que o papel pesado foi colocado em uma bolsa de crescimento de semente para observação de crescimento de raiz (177 mm x 163 mm, fabricado por Daiki Rika Kogyo Co., Ltd.), e 3 sementes de arroz foram semeadas na toalha de papel. A bolsa foi posta em um recipiente plástico, e em seguida selada. Depois da cultura na luz a 25°C durante 7 dias, o comprimento de uma raiz principal foi medido. Uma média de 3 repetições foi determinada e uma taxa de crescimento de raiz foi determinada pela seguinte equação.

Taxa de crescimento de raiz (%) = (Comprimento de raiz principal média na seção tratada por substância química) / (Comprimento de raiz principal média na seção de controle) × 100 - 100

Resultados são mostrados na Figura 4 e Figura 5. No caso da substância química Ic3-1, o crescimento de raiz principal a 10 ppm foi aumentado por 17% e o crescimento de raiz principal a 25 ppm foi aumentado por 20%, relativo à seção de controle (vide Figura 4). No caso da substância química Ic7-1, o crescimento de raiz principal a 10 ppm foi aumentado por 17% e o crescimento de raiz principal a 25 ppm foi aumentado por 19%, relativo à seção de controle (vide Figura 5). Resultados do teste de Dunnett mostraram que houve diferença significativa em um nível significativo de 5% em todas as seções de tratamento, e portanto, houve efeito de promoção de crescimento raiz notável.

Exemplo 12 (Avaliação de atividade de promoção de crescimento de raiz de substância capaz de inibir a sinalização de citocinina por tratamento de semente de arroz)

Com respeito à substância química Ic3-1 e a substância química Ic7-1 (que inibem sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula) selecionada no Exemplo 7, uma atividade de promoção de crescimento de raiz principal induzida por tratamento de semente foi avaliada utilizando arroz (*Oriza sativa* L. japonica). A substância

química foi dissolvida em acetona para preparar uma solução a 10.000 ppm. A solução da substância química acetona (300 µl) desse modo preparada foi posta em um tubo Eppendorf. Em seguida, 15 sementes foram postas no tubo eppendorf. A mistura resultante foi misturada durante cerca de 30 segundos. As sementes, desse modo, tratadas por substância química foram dispersas e secadas em um papel filtro.

Cerca de 820 ml de terra de cultura foram colocados em um recipiente plástico (120 mm em comprimento, 97 mm em altura) com um orifício na base. As sementes tratadas por química foram semeadas no recipiente plástico (15 sementes por recipiente plástico). As sementes foram cultivadas em um lugar escuro a 30°C durante 4 dias e em seguida cultivadas em uma estufa durante 35 dias. Raízes da planta desse modo cultivadas foram removidas e o solo aderido à planta foi lavado, seguido por secagem por congelamento. Em seguida, o peso das raízes depois de secagem por congelamento foi medido. Um teste foi repetido 3 vezes para cada seção de tratamento, e uma média foi determinada. Resultados são mostrados na Figura 6.

No caso do composto lc3-1, o peso seco de raízes por planta aumentou para 119% da seção de controle. No caso do composto lc7-1, o peso seco das raízes por planta aumentou para 126% da seção de controle. Em ambos os casos, efeito de promoção de crescimento de raiz notável foi constatado. No caso de um composto de auxina IAA, o peso de raízes foi suprimido para 87% da seção de controle, e desse modo, o efeito de inibição de crescimento de raiz foi constatado.

Exemplo 13 (Avaliação de atividade de promoção de diferenciação da planta de substância capaz de inibir a sinalização de citocinina, utilizando hipocótilo de *Arabidopsis thaliana*)

Com respeito à substância química lc3-1 e à substância química lc7-1 (que inibem a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula) selecionada no Exemplo 7, uma atividade de promoção de diferenciação da planta foi avaliada examinando-se uma atividade de formação de raiz adventícia utilizando um hipocótilo de *Arabidopsis*

thaliana Columbia.

Primeiro, um meio de ágar para semear *Arabidopsis thaliana* foi preparado. O meio de ágar contém, como componentes por 1 litro de uma solução aquosa, 1 pacote de sais misturados para meio da planta Murashi-ge-Scoog (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.) por 1 litro, 10 g de sacarose, 10 ml de um MES aquoso a 5% de solução de (ácido 2-(N-Morfolino)etanossulfônico) ajustada em pH 5,7 com hidróxido de potássio, 100 mg de inositol, 1 ml de solução de matéria-prima de vitaminas (10 g de cloridrato de tiamina, 1 g de cloridrato de piridoxina, e 1 g de ácido nicotínico por 1 litro de uma solução aquosa) e 8 g de ágar. Em seguida, o meio de ágar foi submetido ao autoclave a 120°C durante 20 minutos, distribuído em placas de petri circulares, e em seguida foi solidificado.

Sementes de *Arabidopsis thaliana* (cerca de 25 µl) foram postas em um tubo de 1,5 ml. A isso foi adicionado 1 ml de uma solução diluída 10 vezes de uma solução de hipoclorito de sódio (Nacalai Tesque) com água destilada esterilizada. A semente foi esterilizada enquanto agitando durante cerca de 1 minuto com um misturador de tubo (TOMY, MT-360, MIXING SPEED10). Depois que as sementes foram sedimentadas por uma centrifuga de tamanho pequeno portátil, a solução diluída da solução de hipoclorito de sódio foi removida do tubo. Depois que 1 ml de água destilada esterilizada foi recentemente adicionada ao tubo, as sementes foram lavadas agitando-se com o misturador de tubo durante cerca de 1 minuto. As sementes foram sedimentadas por uma centrifuga de tamanho pequeno portátil, e em seguida a água depois de lavar foi removida do tubo. A operação de lavagem foi repetida 3 vezes. Depois da conclusão de lavagem, as sementes foram semeadas no meio de ágar na placa de petri circular, e germinadas e crescidas em um lugar escuro a 22°C.

Separadamente, a substância química foi dissolvida em DMSO para preparar uma solução de 10.000 ppm. Além disso, a solução foi diluída com DMSO para preparar soluções de 6.000 ppm, 2.000 ppm, 600 ppm e 200 ppm. Em cada cavidade de uma multiplaca de 12 cavidades (SUMITOMO BAKELITE Co., Ltd.), 2 µl da solução de DMSO contendo um tipo da

substância química em uma concentração foi distribuída. Em uma cavidade como controle, 2 µl de DMSO foi distribuído no lugar da solução de DMSO da substância química. Em seguida, trans-zeatina foi dissolvida em DMSO para preparar uma solução de 10.000 ppm. A solução foi diluída com água destilada esterilizada para preparar uma solução de 10 ppm. Um meio de ágar tendo a composição anterior foi preparado, autoclavado e em seguida resfriado a cerca de 50°C. A este meio de ágar foi adicionado a solução de trans-zeatina de 10 ppm em uma concentração final de 0,01 ppm, seguido por mistura. O meio de ágar contendo trans-zeatina (2 ml cada) foi distribuído em cada cavidade da multiplaca de 12 cavidades em que a solução de DMSO da substância química ou DMSO foi distribuída, e em seguida solidificado.

Uma muda de *Arabidopsis thaliana* depois da germinação e crescimento em um lugar escuro a 22°C foi cortado na porção de hipocotila, e o hipocótilo ao lado com cotilédones foi usado para medida de uma atividade de formação de raiz adventícia como descrito abaixo. A hipocótilo ao lado com raízes foi descartada. Especificamente, o hipocótilo com cotilédones foi inserido no meio de ágar em cada cavidade da multiplaca de 12 cavidades até cerca de 5 mm da porção cortada. A multiplaca foi permitida repousar na luz a 22°C 16 horas (no escuro durante 8 horas). Como resultado, raízes adventícias foram formadas a partir da porção de hipocótilo inserido no meio de ágar contendo a substância química lc3-1 (em todas as seções de teste cada qual tendo uma concentração final de 6 ppm, 2 ppm, 0,6 ppm ou 0,2 ppm) e a porção de hipocótilo inserida no meio de ágar contendo a substância química lc7-1 (em seções de teste cada qual tendo uma concentração final de 6 ppm ou 2 ppm). Na seção de controle em que DMSO foi adicionado no lugar da solução de DMSO da substância química, formação de raízes adventícias a partir da porção de hipocótilo não pôde ser constatada. Resultados de teste no caso do eixo embrionário inserido no meio de ágar contendo a substância química lc3-1 tendo uma concentração final de 0,6 ppm, o hipocótilo inserido no meio de ágar contendo a substância química lc7-1 tendo uma concentração final de 2 ppm, e o hipocótilo inserida no

meio de ágar da seção de controle é mostrada na Figura 7.

Exemplo 14 (Medida utilizando arroz de atividade de promoção de crescimento de raiz de substância capaz de inibir a sinalização de citocinina)

Com respeito à substância química lc3-3, uma atividade de pro-
5 moção de crescimento de raiz foi medida utilizando arroz (*Oriza sativa* japo-
nica Nipponbare).

Primeiro, uma solução de acetona contendo uma concentração
predeterminada da substância química foi preparada e em seguida diluída
100 vezes com água destilada a 10 ppm (contendo 1% de acetona) para
10 obter uma solução de substância química. Sementes foram imersas em á-
gua durante 2 dias para estimular germinação. As sementes foram semea-
das em uma bandeja de tampa de 288 cavidades (3 sementes por cavi-
dade), e em seguida o solo foi encharcado com a solução de substância quími-
ca anterior em uma quantidade de 500 µl por cavidade. Depois de revestir
15 com terra, a bandeja de tampa foi posta em uma bolsa plástica e em seguida
colocada em um ambiente com ar condicionado (lugar escuro a 30°C duran-
te 3 dias. Depois de remover a bolsa plástica da bandeja de tampa, a bande-
ja de tampa foi colocada sob de condições de luz de claro / escuro = 16 h / 8
h durante 4 dias enquanto a base foi irrigada a toda hora. Desse modo, se-
20 mentes de arroz foram cultivadas para obter arroz crescido. As raízes de
arroz resultantes foram lavadas e o comprimento de raiz total foi analisada
utilizando um analisador de imagem de medida de comprimento de raiz
WinRHIZO (fabricado por Regent Instruments). Na seção tratada por subst-
tância química lc3-3, o crescimento da raiz foi notavelmente promovido,
25 quando comparado com a seção de controle (UTC) em que apenas acetona
foi usada no tratamento de encharcamento de solo. Uma fotografia é mos-
trada na Figura 8. Resultados analíticos obtidos pelo analisador de imagem
de medida de comprimento de raiz mostraram um aumento do comprimento
de raiz total na seção tratada por substância química lc3-3. Resultados são
30 mostrados na Figura 9.

Exemplo 15 (Clone de CRE1 cDNA, Nº 2)

Reação de PCR foi realizada utilizando-se o plasmídeo de ex-

pressão p415CYC-CRE1 obtido no Exemplo 5 como um modelo e utilizando-se um DNA de SEQ ID NO: 7 e um DNA de SEQ ID NO: 8 como iniciadores para ampliar um DNA tendo a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2. Detalhes são descritos abaixo.

5 A reação de PCR foi realizada utilizando-se KOD Plus DNA Polimerase (fabricado por TOYOBO Co., Ltd.) sob condição de amplificação que depois de manter quente a 94°C durante 1 minuto, 30 ciclos a 94°C durante 15 segundos, a 58°C durante 30 segundos e a 68°C durante 3 minutos e 30 segundos foram conduzidos. Aqui, um líquido de reação de PCR (50 µl)
10 foi preparado adicionando-se composições de reação tal como dNTP a 500 ng do plasmídeo p415CYC-CRE1 e cada 100 ng de DNAs de iniciador de acordo com a instrução do *kit*.

 O fragmento de DNA desejado desse modo ampliado foi clonado em um vetor pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen Corporation) de acordo com a
15 instrução ligada ao *kit*. Neste caso, o fragmento de DNA desejado foi inserido no vetor pCR-Blunt II-TOPO na direção que permite a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 7 estar perto de um promotor de T7 e a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 8 estar perto de um promotor de Sp6. Foi confirmado que a sequência de nucleotídeo do fragmento de DNA foi inserida na direção correta e foi uma sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2
20 utilizando-se um sequenciador.

Exemplo 16 (Construção de plasmídeo de expressão CRE1)

 Um vetor de expressão de levedura, p425GPD (Munberg e outros. Gene: 156 119-122 (1995), disponível a partir de biblioteca de ATCC
25 (No. 87359)) foi digerido com a enzima de restrição BamHI. Em seguida, o fragmento de DNA obtido no Exemplo 15 (um DNA tendo a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2) foi conectado a uma sequência de promotor de GPD do vetor de expressão p425GPD utilizando-se T4 DNA Ligase, e desse modo incorporado de forma que a proteína desejada poderia ser ex-
30 presso na levedura. Foi confirmado que a sequência de nucleotídeo do fragmento de DNA foi inserida na direção correta e foi uma sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2 utilizando um sequenciador. Desse modo, o

plasmídeo de expressão p425GPD-CRE1 foi obtido.

Exemplo 17 (Produção de célula transformada TM182-p425GPD-CRE1)

5 O plasmídeo de expressão obtido no Exemplo 16 foi usado para transformar uma cepa deficiente de gene *Sln1*, TM182 (*sln1Δ*) (Maeda T e outros. Nature: 369 242-245 (1994)). A transformação foi realizada utilizando-se *S. cerevisiae* Direct Transformation Kit Wako (fabricado por Wako Pure chemicals Industries, Ltd.) de acordo com o manual acompanhante. Visto que uma exigência nutricional de leucina desaparece na célula transformada obtida, uma levedura transformada capaz de crescer em um meio de DOLU -
10 Gal foi selecionada para obter a célula transformada TM182-p425GPD-CRE1.

Da mesma maneira, a célula transformada TM182-p425GPD foi obtida utilizando-se o vetor de expressão de levedura p425GPD.

15 Exemplo 18 (Preparação de fração de proteína de membrana contendo CRE1)

A célula transformada TM182-p425GPD-CRE1 obtida no Exemplo 17 foi quebrada com contas de vidro e em seguida supercentrifugada para preparar uma fração de proteína de membrana contendo CRE1. Detalhes são descritos abaixo.

20 A célula transformada TM182-p425GPD-CRE1 obtida no Exemplo 17 foi semeada em 100 ml de um meio de DOLU + Gal e em seguida incubada a 30°C durante 16 horas para obter um líquido de incubação tendo OD600 = cerca de 1,4. O líquido de incubação foi distribuído em um tubo de centrifuga de 50 ml e em seguida centrifugado a 4°C e 7.400 xg durante 5
25 minutos para coletar células da célula transformada TM182-p425GPD-CRE1. As células resultantes foram novamente suspensas em um tampão de fosfato (preparado misturando-se uma solução de di-idrogenofosfato de sódio a 50 mM aquosa com uma solução de hidrogenofosfato de dissódio a 50 mM aquosa em uma relação de mistura de 4 : 6 e ajustando em pH 7,0)
30 resfriadas a 4°C, distribuídas em um tubo de 2 ml e em seguida centrifugadas a 4°C e 1.000 xg durante 5 minutos para coletar células da célula transformada TM182-p425GPD-CRE1. As células resultantes foram novamente

suspensas no tampão de fosfato resfriado a 4°C e em seguida centrifugadas a 4°C e 1.000 xg durante 5 minutos para coletar células da célula transformada TM182-p425GPD-CRE1. As células resultantes foram novamente suspensas em um tampão de fosfato contendo DTT (ditiotiotreitol) e PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila) (preparado adicionando-se 5 mM de DTT e 0,5 mM de PMSF ao tampão de fosfato descrito acima) em uma quantidade de 3 vezes (com base em células). Em seguida, 200 µl da suspensão foram distribuídos em um tubo de 1,5 ml contendo 250 µl de contas de vidro (0,25 a 0,5 mm de diâmetro) previamente resfriado a 4°C. O tubo de 1,5 ml foi agitado com um misturador de microtubo (MT-360 fabricado por TOMY) na produção máxima durante 30 segundos e em seguida resfriado em gelo durante 1 minuto, e esta operação foi repetida uma vez mais. Além disso, o tubo de 1,5 ml foi agitado com um agitador de múltiplas contas (MB-200, Yasui Kikai Corporation) em uma produção (SPEED METER) de 2.000 durante 30 segundos e em seguida resfriado em gelo durante 1 minuto, e esta operação foi também repetida duas vezes. Em seguida, o tubo de 1,5 ml foi centrifugado a 4°C e 1.500 xg durante 10 minutos para coletar um sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 ml e centrifugado a 4°C e 10.000 xg durante 3 minutos para coletar um sobrenadante. O sobrenadante foi centrifugado a 4°C e 100.000 xg durante 1 hora utilizando uma supercentrifuga para coletar um precipitado. O precipitado resultante foi dissolvido em um tampão de fosfato contendo 1% de monocaprato de sacarose (preparado adicionando-se 1% de monocaprato de sacarose ao tampão de fosfato descrito acima) para obter uma fração de proteína de membrana da célula transformada TM182-p425GPD-CRE1.

Da mesma maneira, uma fração de proteína de membrana da célula transformada TM182-p425GPD foi preparada.

Exemplo 19 (Método para examinar inibição de ligação de citocinina a receptor de citocinina por substância química)

A fração de proteína de membrana da célula transformada TM182-p425GPD-CRE1 obtida no Exemplo 18 e citocinina que foi rotulada com um radioisótopo de hidrogênio, trítio para tornar-se altamente radioativo

foram usadas para examinar que uma substância teste inibiu a ligação de th de citocinina a um receptor de citocinina. Detalhes são descritos abaixo.

Como a citocinina rotulada com um radioisótopo de hidrogênio, trítio para tornar-se altamente radioativo, [3H]N-6-(isopent-2-enil)Adenina
5 fabricado por Amersham Biosciences (em seguida, referido como 2IP radorotulado) foi usado. Teve uma radioatividade específica de 74,0 GBq/mmol e uma concentração de radioatividade de 37,0 MBq/ml.

Primeiro, 100 µg da fração de proteína de membrana da célula transformada TM182-p415CYC1, uma diluição de 2IP radorotulada em uma
10 concentração predeterminada com um tampão de fosfato e 1 µl de uma diluição de substância teste em uma concentração predeterminada com DMSO foram misturadas em um tampão de fosfato para preparar 100 µl de um líquido de reação. Logo, o líquido de reação foi permitido repousar em gelo durante 1 hora e em seguida filtrado com um filtro de vidro GF/B (fabricado
15 por Whatman) para coletar uma fração de proteína de membrana da célula transformada TM182-p425GPD-CRE1. O filtro de vidro foi imerso em um coquetel de cintilação líquido Ultima Gold (fabricado por PerkinElmer Co., Ltd.), e a radioatividade foi medida por uma contadora de cintilação líquida. Para controle, o mesmo teste foi realizado utilizando-se uma fração de prote-
20 ína de membrana da célula transformada TM182-p425GPD. Para eliminar influência de radioatividade devido à ligação não específica do 2IP radorotulado, um valor de radioatividade obtido no teste utilizando a fração de proteína de membrana da célula transformada TM182-p425GPD foi subtraído de um valor de radioatividade obtido no teste utilizando a fração de proteína
25 de membrana da célula transformada TM182-p425GPD-CRE1. Resultados de teste são mostrados na Figura 10.

No caso onde a substância teste foi trans-zeatina ou Ic3-4, a radioatividade foi diminuída quando comparado com o caso onde a substância teste não foi adicionada (apenas DMSO que foi usado como um solvente de
30 uma substância teste) ou a substância teste foi ácido abscísico.

Exemplo 20 (Avaliação de posto de atividade de promoção de estabelecimento de resistência de arroz de substância capaz de inibir a sinalização de

citocinina por tratamento de semente em um teste de semadura direto em campo inundado)

Sementes de arroz (*Oryza sativa japonica* Nipponbare) foram tratadas com a substância química Ic3-1 (que inibe sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula) selecionado no Exemplo 7, e foram crescidas sob condições de semeadura diretas. Em seguida, uma taxa de estabelecimento de resistência foi examinada, e desse modo uma atividade de promoção de estabelecimento de resistência de arroz da substância química foi avaliada.

Primeiro, uma solução de suspensão absoluta contendo 5% (v/v) de Color Coat red (fabricada por BECKER UNDERWOOD), 5% (v/v) de CF-clear (fabricado por BECKER UNDERWOOD) e 0,42% (v/v) de Maxim-XL (fabricado por Syngenta) foi preparada. Em 1,3 ml da solução de suspensão absoluta, 6,25 mg, 12,5 mg, 25 mg ou 50 mg da substância química Ic3-3 foi dissolvido. Sementes foram tratadas com a solução em uma quantidade de 1,3 ml por 50 g de sementes (cada qual correspondendo a 0,125 mg, 0,25 mg, 0,5 mg e 1 mg/g de semente) utilizando um dispositivo de tratamento de semente Hege11 (fabricado por Hans-Ulrich Hege).

Em seguida, um pote de concreto (50 cm × 50 cm) colocado ao ar livre foi inundado em uma profundidade de inundação de 5 cm, e 50 sementes por pote foram semeadas. No dia 23 depois de semear, o número de mudas cujo ápice de folha apareceu na superfície de água foi examinado. Como resultado, uma taxa de estabelecimento de resistência foi aumentada em uma concentração de tratamento de semente de 0,125 a 1 mg / g semente, quando comparado com a seção tratada por suspensão Absoluta. Resultados de teste (média) de cada seção de tratamento (quatro repetições) são mostrados na Tabela 13.

[Taxa de estabelecimento de resistência (%)] = [Número de mudas cujo ápice de folha aparece na superfície de água] / [Número de sementes semeadas] × 100

Tabela 13

Substância química	Quantidade de substância (mg/g semente)	Taxa de estabelecimento de resistência (%) no dia 23 depois de semear
Suspensão Branca		76,7
Ic3-3	0,125	87,3
	0,25	82,7
	0,5	79,3
	1	84,0

Exemplo 21 (Avaliação de promoção de cultivo de arroz de substância capaz de inibir a sinalização de citocinina por tratamento de semente em um teste de semeadura direto em campo seco)

5 Sementes de arroz (*Oryza sativa japonica* Nipponbare) foram tratadas com a substância química Ic3-1 (que inibe sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta de uma célula) selecionadas no Exemplo 7, e foram crescidas sob semeadura direta em condição de campo seco. Em seguida, o número de agricultores foi examinado, e desse modo uma atividade de promoção de cultivo da substância química foi avaliada.

15 Primeiro, uma solução de suspensão Absoluta contendo 5%(v/v) de Color Coat Red (fabricado por BECKER UNDERWOOD), 5%(v/v) de CF-Clear (fabricado por BECKER UNDERWOOD) e 0,42%(v/v) de Maxim-XL (fabricado por Singenta) foi preparada. Em 1,3 ml da solução de suspensão Absoluta, 12,5 mg da substância química Ic3-3 foram dissolvidos. Sementes foram tratadas com a solução em uma quantidade de 1,3 ml por 50 g de sementes (correspondendo a 0,25 mg/g semente) utilizando um dispositivo de tratamento de semente Hege11 (fabricado por Hans-Ulrich Hege).

20 As 20 sementes por pote das sementes tratadas foram semeadas em um pote de 1/5000a Wagner em uma profundidade de 1 cm e em seguida cultivadas em uma estufa. No 10º dia depois de semear, água foi

carregada em uma profundidade de inundação de 5 cm e cultura foi continuada. No dia 30 depois de semear, o número de agricultores foi examinado. Como resultado, o número de agricultores por matéria-prima foi aumentado, quando comparado com a seção tratada por suspensão Absoluta. Resultados de teste (média) de cada seção de tratamento (três repetições) são mostrados na Tabela 11.

Em seguida, o composto (XI) usado na presente invenção será descrito mais especificamente por meio de Exemplos de Síntese e Exemplos de Síntese de Referência, porém o composto (XI) não está limitado a estes exemplos.

Em Exemplos de Síntese e Exemplos de Síntese de Referência, "temperatura ambiente" normalmente significa uma temperatura de 10 a 30°C. ^1H RMN" significa um espectro de ressonância magnética de próton. Utilizando tetrametilsilano como um padrão interno, a medida foi realizada com um espectrômetro (400 MHz), Modelo JNM-AL400, fabricado por JEOL Ltd. e trocas químicas (δ) foram expressas como ppm. "Mp" significa um ponto de fusão e foi medido com um metro de ponto de fusão, Modelo Mettler FP61.

Abreviações usadas nos seguintes Exemplos de Síntese, Exemplos de Síntese de Referência e Tabelas 2, 3, 4 e 5 têm os seguintes significados. CDCl_3 : clorofórmio deuterado, $\text{DMSO}-d_6$: dimetil sulfóxido deuterado, s: singleto, d: duplete, t: tripleto, q: quadruplete, dd: duplete duplo, m: multiplete, br: amplo, J: constante de acoplamento, Me: metila, Et: etila, Pr: propila, i-Pr: isopropila, t-Bu: butila terciária, Ph: fenila, Ac: acetila, THF: tetra-hidrofurano, DMF: N,N-dimetilformamida, DMSO: dimetil sulfóxido e MTBE: éter butil metílico terciário

Exemplo de Síntese 12 (Preparação de 2-amino-6,8-dicloro-4-fenilquinazolina (composto N° Ie-4))

Uma mistura de 300 mg de 2,6,8-tricloro-4-fenilquinazolina (composto N° II-5), 30 g de uma solução de amônia a 28% aquosa e 6 ml de acetonitrilo foi reagida em um vaso de reação resistente à pressão a 105°C durante 1,5 hora. A solução reacional resultante foi resfriada e em seguida

vertida em 100 ml de água. A mistura foi extraída com 60 ml de acetato de etila e o extrato resultante foi concentrado. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel (clorofórmio) para obter 230 mg do composto titulado. Mp. 212,7°C. ¹H RMN (CDCl₃): 5,56 (2H, br. s), 7,54-7,60 (3H, m), 7,63-7,68 (2H, m), 7,74 (1H, d, J = 2,3 Hz), 7,79 (1H, d, J = 2,3 Hz).

Exemplo de Síntese 13 (Preparação de 6-cloro-2-furfurilamino-4-fenilquinazolina (composto N° Ib-8))

Uma mistura de 275 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (composto N° II-2) e 486 mg de furfurilamina foi agitada a 85°C durante 40 minutos e em seguida vertida em 50 ml de água. A mistura foi extraída com acetato de etila, e o extrato resultante foi lavado com água e em seguida concentrado. O resíduo resultante foi recristalizado a partir de etanol para obter 280 mg do composto titulado. Mp. 142,0°C. ¹H RMN (CDCl₃): 4,77 (2H, d, J = 5,6 Hz), 5,70 (1H, br. t, J = 5,6 Hz), 6,29-6,32 (2H, m), 7,36 (1H, dd, J = 1,8, 0,9 Hz), 7,53-7,70 (7H, m), 7,78 (1H, d, J = 2,2 Hz).

Exemplo de Síntese 14 (Preparação de 6-cloro-2-etoxicarbonilmetilamino-4-fenilquinazolina (composto N° Ib-15))

Em 550 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (composto N° II-2) e 419 mg de cloridrato de éster etílico de glicina foram adicionados 3 ml de DMF e 607 mg de trietilamina, seguido por agitação a 85°C durante 5,5 horas. A solução reacional resultante foi vertida em 100 ml de água e extraída com acetato de etila, e em seguida o extrato foi concentrado. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel (hexano: acetato de etila = 6 : 1 a 3 : 1) para obter 503 mg do composto titulado. Mp. 146,1°C. ¹H RMN (CDCl₃): 1,30 (3H, t, J = 7,2 Hz), 4,25 (2H, q, J = 7,2 Hz), 4,31 (2H, d, J = 5,2 Hz), 5,97 (1H, br. s), 7,54-7,63 (5H, m), 7,67-7,70 (2H, m), 7,79 (1H, s).

Exemplo de Síntese 15 (Preparação de 6-cloro-2-formamido-4-fenilquinazolina (composto N° Ib-17))

Em uma solução de 54 mg de formamida seca em DMF (5 ml) foi adicionado 48 mg de hidreto de sódio (60%), seguido por agitação em temperatura ambiente durante 30 minutos. À mistura de reação foi adiciona-

do 275 mg de 2,6-dicloro-4-fenilquinazolina (composto N° II-2), seguido por aquecimento a 85°C e outra agitação durante 3 horas. A solução reacional resultante foi vertida em 100 ml de água e extraída com acetato de etila, e em seguida extrato foi concentrado. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel (acetato de etila: hexano = 1 : 3) para obter 64 mg do composto titulado. Mp. 252,1°C. ¹H RMN: 7,59-7,66 (3H, m), 7,72-7,81 (3H, m), 7,88 (1H, d, J = 8,8 Hz), 8,02 (1H, d, J = 2,0 Hz), 8,37 (1H, br. d, J = 10,4 Hz), 9,71 (1H, d, J = 10,4 Hz).

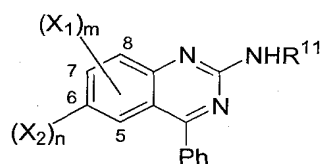
Exemplos de compostos que podem ser preparados da mesma maneira como em Exemplos de Síntese descritos acima são mostrados na Tabela 14 e Tabela 15 (da mesma forma incluindo os compostos preparados nos Exemplos de Síntese descritos acima). Notas "a)", "b)" e "c)" na Tabela 14 e Tabela 15 são como segue.

a) ¹H RMN (CDCl₃): 1,66-1,75 (1H, m), 1,86-2,08 (3H, m), 3,57-3,64 (1H, m), 3,75-3,83 (2H, m), 3,89-3,59 (1H, m), 4,13-4,20 (1H, m), 5,70 (1H, br. s), 7,52-7,60 (5H, m), 7,64-7,69 (2H, m), 7,75-7,76 (1H, m).

b) ¹H RMN (CDCl₃): 1,22 (3H, t, J = 7,0 Hz), 3,55 (2H, q, J = 7,0 Hz), 3,68 (2H, t, J = 5,2 Hz), 3,78 (2H, q-semelhante, J = 5,2 Hz), 5,75 (1H, br. t), 7,53-7,60 (5H, m), 7,65-7,69 (2H, m), 7,75-7,77 (1H, m).

c) ¹H RMN (CDCl₃): 1,22 (3H, t, J = 7,0 Hz), 1,96 (2H, quinteto, J = 6,3 Hz), 3,50 (2H, q, J = 7,0 Hz), 3,58 (2H, t, J = 6,3 Hz), 3,67 (2H, q-semelhante, J = 6,3 Hz), 5,65 (1H, br. t), 7,53-7,60 (5H, m), 7,65-7,69 (2H, m), 7,74-7,76 (1H, m).

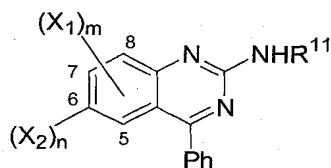
Tabela 14



Composto Nº	R ¹¹	m	X ₁	n	X ₂	Ponto de fusão (°C)
Ia-1	(CH ₂) ₃ OH	1	5-Cl	0	-	175,7
Ib-1	(CH ₂) ₄ OH	0	-	1	Cl	115,6
Ib-2	(CH ₂) ₅ OH	0	-	1	Cl	117,2
Ib-3	(CH ₂) ₂ OMe	0	-	1	Cl	89,7
Ib-4	n-Pr	0	-	1	Cl	158,3
Ib-5	(CH ₂) ₂ CHMe ₂	0	-	1	Cl	90,1
Ib-6	(CH ₂) ₆ OH	0	-	1	Cl	107,9
Ib-7	(CH ₂) ₂ CH(Me)CH ₂ OH	0	-	1	Cl	112,7
Ib-8	furfurila	0	-	1	Cl	142,0
Ib-9	CH ₂ CH=CMe ₂	0	-	1	Cl	95,9
Ib-10	CH ₂ CH=C(Me)CH ₂ OH	0	-	1	Cl	154,8
Ib-11	Et	0	-	1	Cl	156,7
Ib-12	i-Pr	0	-	1	Cl	112,5
Ib-13	CH ₂ CH=CH ₂	0	-	1	Cl	147,3
Ib-14	CH ₂ C≡CH	0	-	1	Cl	168,4
Ib-15	CH ₂ CO ₂ Et	0	-	1	Cl	146,1
Ib-16	CH ₂ CH ₂ CN	0	-	1	Cl	198,7
Ib-17	CHO	0	-	1	Cl	252,1
Ib-18	tetra-hidrofurfurila	0	-	1	Cl	xarope, a)
Ib-19	(CH ₂) ₃ OMe	0	-	1	Cl	89,1
Ib-20	CH ₂ CH(OH)CH ₃	0	-	1	Cl	154,2
Ib-21	(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ OH	0	-	1	Cl	117,4
Ib-22	CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	0	-	1	Cl	147,0

Ib-23	CH ₂ CO ₂ Me	0	-	1	Cl	190,5
Ib-24	CH ₂ CH ₂ CO ₂ Me	0	-	1	Cl	117,1
Ib-25	CH(Me)CH ₂ OH	0	-	1	Cl	52,8
Ib-26	CH ₂ CH ₂ OEt	0	-	1	Cl	xarope, b)
Ib-27	(CH ₂) ₃ OEt	0	-	1	Cl	xarope, c)

Tabela 15



Composto N°	R ¹¹	m	X ₁	n	X ₂	Ponto de fusão (°C)
Ic-1	(CH ₂) ₃ OH	1	7-Cl	0	-	129,7
Id-1	(CH ₂) ₃ OH	1	8-Cl	0	-	115,5
Ie-1	(CH ₂) ₃ OH	1	8-Cl	1	Cl	146,2
Ie-2	CH ₂ CH ₂ OH	1	8-Cl	1	Cl	168,8
Ie-3	furfurila	1	8-Cl	1	Cl	158,6
Ie-4	H	1	8-Cl	1	Cl	212,7
Ie-5	CH ₂ CN	1	8-Cl	1	Cl	204,7
Ie-6	CH ₂ CO ₂ Me	1	8-Cl	1	Cl	201,4
Se-1	(CH ₂) ₃ OH	0	-	1	Br	140,9
Se-2	CH ₂ CO ₂ Me	0	-	1	Br	183,1 (decomposição)
Ig-1	H	0	-	1	CF ₃	160,4
Ig-2	(CH ₂) ₃ OH	0	-	1	CF ₃	135,1
Ih-1	(CH ₂) ₃ OH	0	-	1	CN	173,3 (decomposição)

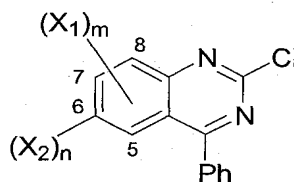
Exemplo de Síntese de Referência 3 (Preparação de 2,8-dicloro-4-fenilquinazolina (composto N° II-4))

Em 1.24 g de 8-cloro-4-fenil-2(1H)-quinazolinona (composto N°

- IV-4) foi adicionado 6,65 g de oxiclreto de fósforo, seguido por agitação a 95°C durante 1 hora. A solução reacional resultante foi vertida em 200 ml de água gelada e bicarbonato de sódio foi adicionado a isso, desse modo ajustando o pH 9. Em seguida, cristais precipitados foram coletados por filtração e recristalizados a partir de etanol para obter 1,07 g do composto titulado. Mp.154,4°C. ¹H RMN (CDCl₃): 7,52-7,65 (4H, m), 7,76-7,80 (2H, m), 8,02-8,08 (2H, m).

- Exemplos de compostos que podem ser preparados da mesma maneira como em Exemplo Síntese de Referência 3 descrito acima são mostrados na Tabela 16 (da mesma forma incluindo os compostos preparados em Exemplo de Síntese de Referência 3).

Tabela 16



Composto N°	m	X ₁	n	X ₂	Ponto de fusão (°C)
II-1	1	5-Cl	0	-	125,7
II-2	0	-	1	Cl	166,2
II-3	1	7-Cl	0	-	115,4
II-4	1	8-Cl	0	-	154,4
II-5	1	8-Cl	1	Cl	160,3
II-6	0	-	1	Br	185,1 (decomposição)
II-7	0	-	1	CF ₃	117,5 (decomposição)
II-8	0	-	1	CN	206,8 (decomposição)

Exemplo de Síntese de Referência 4 (Preparação de 8-cloro-4-fenil-2(1H)-quinazolinona (composto N° IV-4)))

Em 7,10 g de brometo de fenilmagnésio (32% de solução de THF) foi adicionado gota a gota uma solução de 953 mg de 2-amino-3-clorobenzonitrilo em THF (7 ml) em temperatura ambiente, seguido por aquecimento sob refluxo durante 30 minutos. Ao produto de reação resultante foi adicionado gota a gota 885 mg de clorocarbonato de metila sob resfriamento com gelo, seguido por aquecimento sob refluxo durante 40 minutos. A solução reacional resultante foi resfriada e vertida em 40 ml de ácido 2N-clorídrico, e 8 g de bicarbonato de sódio e 20 ml de MTBE foram adicionados a isso, seguido por agitação. Em seguida, cristais precipitados foram coletados por filtração para obter 1,30 g do composto titulado. ^1H RMN (DMSO-d_6): 7,24(1H, t, $J = 8,0$ Hz), 7,57-7,70 (6H, m), 7,90-7,93 (1H, m), 11,45 (1H, br. s).

Exemplo de Síntese de Referência 5 (Preparação de 4-fenil-6-trifluorometil-2(1H)-quinazolinona (composto N° IV-7)))

Em uma solução de 762 mg de 2-amino-5-trifluorometilbenzofenona em 10 ml de clorofórmio foi adicionado gota a gota 349 mg de trietilamina, e em seguida 627 mg de cloreto de tricloroacetila foi adicionado gota a gota sob resfriamento com gelo. Depois de agitar na mesma temperatura durante 30 min, 50 ml de água foi adicionado, desse modo separando camadas. A camada orgânica foi coletada e concentrada. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel (hexano : acetato de etila = 5 : 1) para obter 1,08 g de 2'-benzoil-2,2,2-tricloro-4'-trifluorometilacetanilida. ^1H RMN (CDCl_3): 7,53-7,58 (2H, m), 7,66-7,75 (3H, m), 7,90-7,95 (2H, m), 8,81 (1H, d, $J = 8,6$ Hz), 12,38 (1H, br. s).

Uma mistura de 1,08 g de 2'-benzoil-2,2,2-tricloro-4'-trifluorometilacetanilida, 10 ml de DMSO e 1,18 g de acetato de amônio foi agitado a 75°C durante 1 hora. Depois de resfriar, 100 ml de água foi adicionado à mistura. Cristais precipitados foram coletados por filtração. A substância coletada foi dissolvida em uma mistura de hexano : acetato de etila = 1 : 1, desidratada utilizando sulfato de magnésio anidro, e em seguida

concentrada para obter 765 mg do composto titulado. ^1H RMN (CDCl_3): 7,58-7,68 (3H, m), 7,75 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), 7,79-7,83 (2H, m), 7,93 (1H, dd, $J = 8,8, 1,7$ Hz), 8,17 (1H, br. s), 13,37 (1H, br. s).

Exemplos de compostos que podem ser preparados da mesma maneira como no Exemplo de Síntese de Referência 4 descritos acima são mostrados na Tabela 17 (da mesma forma incluindo os compostos preparados no Exemplo de Síntese de Referência 4 descrito acima). Notas "a)" a "g)" na Tabela 17 são como segue.

a) ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$): 7,27 (1H, dd, $J = 7,7, 1,0$ Hz), 7,38 (1H, dd, $J = 8,3, 1,1$ Hz), 7,43-7,55 (5H, m), 7,69 (1H, t, $J = 8,1$ Hz), 12,18 (1H, br. s).

b) (não isolado e purificado)

c) ^1H RMN descrito no Exemplo de Síntese de Referência 4

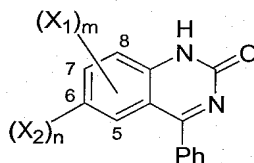
d) ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$): 7,52-7,72 (6H, m), 8,10-8,12 (1H, m), 11,69 (1H, br. s).

e) ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$): 7,35 (1H, d, $J = 9,2$ Hz), 7,59-7,71 (6H, m), 7,91 (1H, dd, $J = 9,2, 2,2$ Hz), 12,08 (1H, br. s).

f) ^1H RMN descrito no Exemplo de Síntese de Referência 5

g) ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$): 7,48 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 7,60-7,68 (3H, m), 7,71-7,74 (2H, m), 8,05 (1H, s), 8,08-8,12 (1H, m), 12,36 (1H, br. s).

Tabela 17



Composto N°	m	X ₁	n	X ₂	Ponto de fusão (°C)
IV-1	1	5-Cl	0	-	a)
IV-2	0	-	1	Cl	>300
IV-3	1	7-Cl	0	-	b)
IV-4	1	8-Cl	0	-	c)
IV-5	1	8-Cl	1	Cl	d)
IV-6	0	-	1	Br	e)
IV-7	0	-	1	CF ₃	f)
IV-8	0	-	1	CN	g)

Exemplo 22 (Teste de Atividade de Promoção de Crescimento de Raiz)

Meio padrão de Enshi tendo a seguinte composição (vide Tabela 18) foi preparado. Aos tubos em grupo foi distribuído a cada, 4 µl de uma solução de uma substância química em DMSO em uma concentração de final 0,001 ppm a 10 ppm, e em seguida, foi distribuído a cada, 600 µl do meio padrão de Enshi esterilizado. Em seguida, a solução resultante foi bem misturada. Em cada um dos tubos em grupo, 10-20 sementes de *Arabidopsis thaliana* foram semeadas, e cultivadas a 22°C durante 10 dias na luz. Em seguida, o comprimento de raízes principais (raízes principais média) gerado a partir das sementes de *Arabidopsis thaliana* foi medido. Uma média de oito repetições foi determinada, e uma taxa de crescimento de raiz foi determinada de acordo com a seguinte equação. Como um resultado, uma substância química que exibiu uma taxa de crescimento de raiz significativa (por exemplo, uma taxa de crescimento de raiz de 120% ou mais) poderia ser julgada ter uma atividade de promoção de crescimento de raiz.

Como resultados detalhados, concentrações finais que exibiram as taxas de crescimento de raiz mais altas foram mostradas na Tabela 19.

Taxa de crescimento de raiz (%) = (Comprimento de raiz principal média na seção tratada por substância química) / (Comprimento de raiz principal média na seção de controle) × 100

Meio padrão de Enshi determinado tendo a seguinte composição (Tabela 18) foi preparado. Uma solução de DMSO de uma substância química foi distribuída por 4 µl aos tubos em grupo em uma concentração final de 0,001 ppm a 10 ppm e o meio padrão de Enshi esterilizado foi distribuído por 600 µl e em seguida a solução resultante foi bem misturada. 10-20 sementes de *A. thaliana* por tubos em grupo foram semeadas nos tubos em grupo. Depois da cultura a 22°C durante 10 dias em luz luminosa, o comprimento de raízes principais (raízes principais média) tirado de sementes de *A. thaliana* foi medido. Uma média de oito repetições foi determinada e a taxa de crescimento de raiz foi determinada. Como um resultado, uma substância química que exibiu taxa de crescimento de raiz significativa (por exemplo, a taxa de crescimento de raiz é 120% ou mais) pode ser considerada uma substân-

cia química com atividade de promoção de crescimento de raiz.

Como resultados detalhados, um valor que exibiu a taxa de crescimento de raiz mais alta na concentração final anterior foi mostrado na Tabela 19.

- 5 Taxa de crescimento de raiz (%) = (Comprimento de raiz principal média de seção tratada por substância química) / (Comprimento de raiz principal médio de seção de controle) × 100

Tabela 18

Composição		Concentração (mg/L)
Nitrato de cálcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	950
Nitrato de potássio	KNO_3	810
Sulfato de magnésio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500
Fosfato de amônio	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	155
Ferro quelado	Fe-EDTA	22,62
Ácido bórico	H_3BO_3	2,86
Sulfato de manganês	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81
Sulfato de zinco	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08
Molibdato de sódio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025
Ajustado em pH 5,8		

10 Tabela 19

Composto Nº	Concentração final de teste (ppm)	Atividade de promoção de crescimento de raiz
Ia-1	2,5	150,9
Ib-1	0,625	129,5
Ib-2	0,625	134,0
Ib-3	1,25	142,5
Ib-4	1,25	136,4
Ib-5	10	120,6
Ib-6	1,25	128,2
Ib-7	1,25	128,9

lb-8	5	155,3
lb-9	10	121,3
lb-10	2,5	139,5
lb-11	1,25	122,8
lb-12	10	120,4
lb-13	10	122,4
lb-15	10	140,4
lb-17	2,5	134,0
lb-18	5	138,5
lb-19	5	141,9
lb-20	10	169,0
lb-21	0,625	125,8
lb-22	5	134,5
lb-23	0,625	128,6
lb-24	2,5	137,9
lb-25	1,25	126,5
lb-27	2,5	121,6
lc-1	10	163,6
ld-1	5	143,9
le-1	2,5	184,6
le-3	2,5	138,8
lg-2	2,5	155,9
lh-1	10	141,5

Formulações de meios usados na presente invenção são descritas abaixo.

(a) DOLU + Glu médio

Base de nitrogênio de Bacto-levedura sem aminoácidos 6,7g

5 Glicose, 20 g

SC-HIS-LEU-URA (Q-BIOgene) 1,66 g

Histidina 0,076g

Água destilada 1000 ml

(b) DOLU + Gal médio

Base de nitrogênio de Bacto-levedura sem aminoácidos 6,7g

Glicose 20 g

SC-HIS-LEU-URA (Q-BIOgene) 1,66 g

Histidina 0,076g

5 Água destilada 1000 ml

Aplicabilidade industrial

De acordo com a presente invenção, é possível fornecer um agente capaz de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta, e um método para avaliar uma substância química tendo uma atividade biológica útil cujo alvo tornou-se claro, isto é, um método para avaliar uma substância química utilizando uma atividade em um alvo específico como um indicador para quimicamente controlar um sítio alvo.

Texto Livre de Listagem de Sequência

SEQ ID NO: 3

15 Iniciador de oligonucleotídeo alvo para PCR

SEQ ID NO: 4

Iniciador de oligonucleotídeo alvo para PCR

SEQ ID NO: 5

Iniciador de oligonucleotídeo alvo para PCR

20 SEQ ID NO: 6

Iniciador de oligonucleotídeo alvo para PCR

SEQ ID NO: 7

Iniciador de oligonucleotídeo alvo para PCR

SEQ ID NO: 8

25 Iniciador de oligonucleotídeo alvo para PCR

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> SUMITOMO CHEMICAL COMPANY, LIMITED

<120> Agente para inibir a sinalização de citotocina

<130> S17000W001

<150> JP2006-315308

<151> 2006-11-22

<150> JP2006-315309

<151> 2006-11-22

<150> JP2007-022849

<151> 2007-02-01

<150> JP2007-022850

<151> 2007-02-01

<160> 8

<210> 1

<211> 1057

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 1

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

Ala Asn Lys Ile Arg Arg Glu Glu Val Leu Val Ser Met Cys Asp Gln			
130	135	140	
Arg Ala Arg Met Leu Gln Asp Gln Phe Ser Val Ser Val Asn His Val			
145	150	155	160
His Ala Leu Ala Ile Leu Val Ser Thr Phe His Tyr His Lys Asn Pro			
165	170	175	
Ser Ala Ile Asp Gln Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Thr Ala Arg Thr Ala			
180	185	190	
Phe Glu Arg Pro Leu Leu Ser Gly Val Ala Tyr Ala Glu Lys Val Val			
195	200	205	
Asn Phe Glu Arg Glu Met Phe Glu Arg Gln His Asn Trp Val Ile Lys			
210	215	220	
Thr Met Asp Arg Gly Glu Pro Ser Pro Val Arg Asp Glu Tyr Ala Pro			
225	230	235	240
Val Ile Phe Ser Gln Asp Ser Val Ser Tyr Leu Glu Ser Leu Asp Met			
245	250	255	
Met Ser Gly Glu Glu Asp Arg Glu Asn Ile Leu Arg Ala Arg Glu Thr			
260	265	270	
Gly Lys Ala Val Leu Thr Ser Pro Phe Arg Leu Leu Glu Thr His His			
275	280	285	
Leu Gly Val Val Leu Thr Phe Pro Val Tyr Lys Ser Ser Leu Pro Glu			
290	295	300	
Asn Pro Thr Val Glu Glu Arg Ile Ala Ala Thr Ala Gly Tyr Leu Gly			
305	310	315	320
Gly Ala Phe Asp Val Glu Ser Leu Val Glu Asn Leu Leu Gly Gln Leu			
325	330	335	
Ala Gly Asn Gln Ala Ile Val Val His Val Tyr Asp Ile Thr Asn Ala			
340	345	350	
Ser Asp Pro Leu Val Met Tyr Gly Asn Gln Asp Glu Glu Ala Asp Arg			
355	360	365	
Ser Leu Ser His Glu Ser Lys Leu Asp Phe Gly Asp Pro Phe Arg Lys			
370	375	380	
His Lys Met Ile Cys Arg Tyr His Gln Lys Ala Pro Ile Pro Leu Asn			
385	390	395	400
Val Leu Thr Thr Val Pro Leu Phe Phe Ala Ile Gly Phe Leu Val Gly			
405	410	415	
Tyr Ile Leu Tyr Gly Ala Ala Met His Ile Val Lys Val Glu Asp Asp			
420	425	430	
Phe His Glu Met Gln Glu Leu Lys Val Arg Ala Glu Ala Ala Asp Val			
435	440	445	
Ala Lys Ser Gln Phe Leu Ala Thr Val Ser His Glu Ile Arg Thr Pro			
450	455	460	
Met Asn Gly Ile Leu Gly Met Leu Ala Met Leu Leu Asp Thr Glu Leu			
465	470	475	480
Ser Ser Thr Gln Arg Asp Tyr Ala Gln Thr Ala Gln Val Cys Gly Lys			

	485		490		495
Ala	Leu	Ile	Ala	Leu	Ile
	500		505		510
Ala	Gly	Lys	Leu	Glu	Leu
	515		520		525
Leu	Asp	Asp	Val	Leu	Ser
	530		535		540
Ile	Glu	Leu	Ala	Val	Phe
	545		550		555
Gly	Asp	Ser	Gly	Arg	Phe
	565		570		575
Ser	Val	Lys	Phe	Thr	Glu
	580		585		590
Ala	Glu	Gln	Ser	Lys	Asp
	595		600		605
Gly	Val	Ser	Glu	Glu	Met
	610		615		620
Thr	Leu	Ser	Gly	Tyr	Glu
	625		630		635
Phe	Lys	His	Leu	Val	Ser
	645		650		655
Ser	Ser	Asn	Val	Arg	Leu
	660		665		670
Ile	Pro	Leu	Val	Ala	Gln
	675		680		685
Asp	Ser	Ser	Thr	Ser	Arg
	690		695		700
Ile	Ser	Lys	Cys	Leu	Val
	705		710		715
Ser	Arg	Pro	His	Ile	Gly
	725		730		735
Lys	Cys	Asp	Lys	Cys	Ser
	740		745		750
Glu	His	Leu	Pro	Ser	Thr
	755		760		765
Ala	Lys	Pro	Val	Arg	Ala
	770		775		780
Gly	Ile	Asn	Val	Asp	Val
	785		790		795
Ala	Ala	Ala	Phe	Glu	Arg
	805		810		815
Leu	Asp	Met	Ile	Leu	Val
	820		825		830
Asn	Asp	Ser	Glu	Ile	Arg
	835		840		845

His His Lys Ser Pro Lys Leu Ala Leu Phe Ala Thr Asn Ile Thr Asn
 850 855 860
 Ser Glu Phe Asp Arg Ala Lys Ser Ala Gly Phe Ala Asp Thr Val Ile
 865 870 875 880
 Met Lys Pro Leu Arg Ala Ser Met Ile Gly Ala Cys Leu Gln Gln Val
 885 890 895
 Leu Glu Leu Arg Lys Thr Arg Gln Gln His Pro Glu Gly Ser Ser Pro
 900 905 910
 Ala Thr Leu Lys Ser Leu Leu Thr Gly Lys Lys Ile Leu Val Val Asp
 915 920 925
 Asp Asn Ile Val Asn Arg Arg Val Ala Ala Gly Ala Leu Lys Lys Phe
 930 935 940
 Gly Ala Glu Val Val Cys Ala Glu Ser Gly Gln Val Ala Leu Gly Leu
 945 950 955 960
 Leu Gln Ile Pro His Thr Phe Asp Ala Cys Phe Met Asp Ile Gln Met
 965 970 975
 Pro Gln Met Asp Gly Phe Glu Ala Thr Arg Gln Ile Arg Met Met Glu
 980 985 990
 Lys Glu Ala Lys Glu Lys Thr Asn Leu Glu Trp His Leu Pro Ile Leu
 995 1000 1005
 Ala Met Thr Ala Asp Val Ile His Ala Thr Tyr Glu Glu Cys Leu Lys
 1010 1015 1020
 Ser Gly Met Asp Gly Tyr Val Ser Lys Pro Phe Glu Glu Glu Asn Leu
 1025 1030 1035 1040
 Tyr Lys Ser Val Ala Lys Ser Phe Lys Pro Asn Pro Ile Ser Pro Ser
 1045 1050 1055
 Ser

<210> 2

<211> 3174

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3174)

<400> 2

atg aac tgg gca ctc aac aat cat caa gaa gaa gaa gaa gag cca cga 48
 Met Asn Trp Ala Leu Asn Asn His Gln Glu Glu Glu Glu Glu Pro Arg
 1 5 10 15
 aga att gaa att tct gat tcc gag tca cta gaa aac ttg aaa agc agc 96
 Arg Ile Glu Ile Ser Asp Ser Glu Ser Leu Glu Asn Leu Lys Ser Ser
 20 25 30

gat ttt tat caa ctg ggt ggt ggt ggt gct ctg aat tcg tca gaa aag	144
Asp Phe Tyr Gln Leu Gly Gly Gly Gly Ala Leu Asn Ser Ser Glu Lys	
35 40 45	
ccg aga aag atc gat ttt tgg cgt tcg ggg ttg atg ggt ttt gcg aag	192
Pro Arg Lys Ile Asp Phe Trp Arg Ser Gly Leu Met Gly Phe Ala Lys	
50 55 60	
atg cag cag cag caa cag ctt cag cat tca gtg gcg gtg aag atg aac	240
Met Gln Gln Gln Gln Gln Leu Gln His Ser Val Ala Val Lys Met Asn	
65 70 75 80	
aat aat aat aat aac gat cta atg ggt aat aaa aaa ggg tca act ttc	288
Asn Asn Asn Asn Asn Asp Leu Met Gly Asn Lys Lys Gly Ser Thr Phe	
85 90 95	
ata caa gaa cat cga gca ttg tta cca aaa gct ttg att ctg tgg atc	336
Ile Gln Glu His Arg Ala Leu Leu Pro Lys Ala Leu Ile Leu Trp Ile	
100 105 110	
atc att gtt ggg ttt ata agc agt ggg att tat cag tgg atg gat gat	384
Ile Ile Val Gly Phe Ile Ser Ser Gly Ile Tyr Gln Trp Met Asp Asp	
115 120 125	
gct aat aag att aga agg gaa gag gtt ttg gtc agc atg tgt gat caa	432
Ala Asn Lys Ile Arg Arg Glu Glu Val Leu Val Ser Met Cys Asp Gln	
130 135 140	
aga gct aga atg ttg cag gat caa ttt agt gtt agt gtt aat cat gtt	480
Arg Ala Arg Met Leu Gln Asp Gln Phe Ser Val Ser Val Asn His Val	
145 150 155 160	
cat gct ttg gct att ctc gtc tcc act ttt cat tac cac aag aac cct	528
His Ala Leu Ala Ile Leu Val Ser Thr Phe His Tyr His Lys Asn Pro	
165 170 175	
tct gca att gat cag gag aca ttt gcg gag tac acg gca aga aca gca	576
Ser Ala Ile Asp Gln Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Thr Ala Arg Thr Ala	
180 185 190	
ttt gag aga ccg ttg cta agt gga gtg gct tat gct gaa aaa gtt gtg	624
Phe Glu Arg Pro Leu Leu Ser Gly Val Ala Tyr Ala Glu Lys Val Val	
195 200 205	

aat ttt gag agg gag atg ttt gag cgg cag cac aat tgg gtt ata aag	672
Asn Phe Glu Arg Glu Met Phe Glu Arg Gln His Asn Trp Val Ile Lys	
210 215 220	
aca atg gat aga gga gag cct tca ccg gtt agg gat gag tat gct cct	720
Thr Met Asp Arg Gly Glu Pro Ser Pro Val Arg Asp Glu Tyr Ala Pro	
225 230 235 240	
gtt ata ttc tct caa gat agt gtc tct tac ctt gag tca ctc gat atg	768
Val Ile Phe Ser Gln Asp Ser Val Ser Tyr Leu Glu Ser Leu Asp Met	
245 250 255	
atg tca ggc gag gag gat cgt gag aat att ttg cga gct aga gaa acc	816
Met Ser Gly Glu Glu Asp Arg Glu Asn Ile Leu Arg Ala Arg Glu Thr	
260 265 270	
gga aaa gct gtc ttg act agc cct ttt agg ttg ttg gaa act cac cat	864
Gly Lys Ala Val Leu Thr Ser Pro Phe Arg Leu Leu Glu Thr His His	
275 280 285	
ctc gga gtt gtg ttg aca ttc cct gtc tac aag tct tct ctt cct gaa	912
Leu Gly Val Val Leu Thr Phe Pro Val Tyr Lys Ser Ser Leu Pro Glu	
290 295 300	
aat ccg act gtc gaa gag cgt att gca gcc act gca ggg tac ctt ggt	960
Asn Pro Thr Val Glu Glu Arg Ile Ala Ala Thr Ala Gly Tyr Leu Gly	
305 310 315 320	
ggt gcg ttt gat gtg gag tct cta gtc gag aat tta ctt ggt cag ctt	1008
Gly Ala Phe Asp Val Glu Ser Leu Val Glu Asn Leu Leu Gly Gln Leu	
325 330 335	
gct ggt aac caa gca ata gtt gtg cat gtg tat gat atc acc aat gca	1056
Ala Gly Asn Gln Ala Ile Val Val His Val Tyr Asp Ile Thr Asn Ala	
340 345 350	
tca gat cca ctt gtc atg tat ggt aat caa gat gaa gaa gcc gac aga	1104
Ser Asp Pro Leu Val Met Tyr Gly Asn Gln Asp Glu Glu Ala Asp Arg	
355 360 365	
tct ctc tct cat gag agc aag ctc gat ttt gga gac ccc ttc agg aaa	1152
Ser Leu Ser His Glu Ser Lys Leu Asp Phe Gly Asp Pro Phe Arg Lys	
370 375 380	
cat aag atg ata tgc agg tac cac caa aag gca cca ata cca ttg aat	1200

[illegible]

	565	570	575	
tcg gtt aaa ttc aca gag aaa gga cat atc ttt gtt aaa gtc cat ctt				1776
Ser Val Lys Phe Thr Glu Lys Gly His Ile Phe Val Lys Val His Leu				
	580	585	590	
gcg gaa caa tca aaa gat gaa tct gaa ccg aaa aat gca ttg aat ggt				1824
Ala Glu Gln Ser Lys Asp Glu Ser Glu Pro Lys Asn Ala Leu Asn Gly				
	595	600	605	
gga gtg tct gaa gaa atg atc gtt gtt tcc aaa cag tca agt tac aac				1872
Gly Val Ser Glu Glu Met Ile Val Val Ser Lys Gln Ser Ser Tyr Asn				
	610	615	620	
aca ttg agc ggt tac gaa gct gct gat ggt cgg aat agc tgg gat tca				1920
Thr Leu Ser Gly Tyr Glu Ala Ala Asp Gly Arg Asn Ser Trp Asp Ser				
	625	630	635	640
ttc aag cat ttg gtc tct gag gag cag tca tta tcg gag ttt gat att				1968
Phe Lys His Leu Val Ser Glu Glu Gln Ser Leu Ser Glu Phe Asp Ile				
	645	650	655	
tct agc aat gtt agg ctt atg gtt tca atc gaa gac acg ggt att gga				2016
Ser Ser Asn Val Arg Leu Met Val Ser Ile Glu Asp Thr Gly Ile Gly				
	660	665	670	
atc cct tta gtt gca caa ggc cgt gtg ttt atg ccg ttt atg caa gca				2064
Ile Pro Leu Val Ala Gln Gly Arg Val Phe Met Pro Phe Met Gln Ala				
	675	680	685	
gat agc tcg act tca aga aac tat gga ggt act ggt att ggt ttg agt				2112
Asp Ser Ser Thr Ser Arg Asn Tyr Gly Gly Thr Gly Ile Gly Leu Ser				
	690	695	700	
ata agc aag tgt ctt gtt gaa ctt atg cgt ggt cag ata aat ttc ata				2160
Ile Ser Lys Cys Leu Val Glu Leu Met Arg Gly Gln Ile Asn Phe Ile				
	705	710	715	720
agc cgg cct cat att gga agc acg ttc tgg ttc acg gct gtt tta gag				2208
Ser Arg Pro His Ile Gly Ser Thr Phe Trp Phe Thr Ala Val Leu Glu				
	725	730	735	
aaa tgc gat aaa tgc agt gcg att aac cat atg aag aaa cct aat gtg				2256
Lys Cys Asp Lys Cys Ser Ala Ile Asn His Met Lys Lys Pro Asn Val				
	740	745	750	

gaa cac ttg cct tct act ttt aaa gga atg aaa gct ata gtt gtt gat	2304
Glu His Leu Pro Ser Thr Phe Lys Gly Met Lys Ala Ile Val Val Asp	
755 760 765	
gct aag cct gtt aga gct gct gtg act aga tac cat atg aaa aga ctc	2352
Ala Lys Pro Val Arg Ala Ala Val Thr Arg Tyr His Met Lys Arg Leu	
770 775 780	
gga atc aat gtt gat gtc gtg aca agt ctc aaa acc gct gtt gtt gca	2400
Gly Ile Asn Val Asp Val Val Thr Ser Leu Lys Thr Ala Val Val Ala	
785 790 795 800	
gct gct gcg ttt gaa aga aac ggt tct cct ctc cca aca aaa ccg caa	2448
Ala Ala Ala Phe Glu Arg Asn Gly Ser Pro Leu Pro Thr Lys Pro Gln	
805 810 815	
ctt gat atg atc tta gta gag aaa gat tca tgg att tca act gaa gat	2496
Leu Asp Met Ile Leu Val Glu Lys Asp Ser Trp Ile Ser Thr Glu Asp	
820 825 830	
aat gac tca gag att cgt tta ttg aat tca aga acc aac gga aac gtt	2544
Asn Asp Ser Glu Ile Arg Leu Leu Asn Ser Arg Thr Asn Gly Asn Val	
835 840 845	
cat cac aag tct ccg aaa cta gct cta ttc gca aca aac atc aca aat	2592
His His Lys Ser Pro Lys Leu Ala Leu Phe Ala Thr Asn Ile Thr Asn	
850 855 860	
tcg gag ttc gac aga gct aaa tcc gca gga ttt gca gat acg gta ata	2640
Ser Glu Phe Asp Arg Ala Lys Ser Ala Gly Phe Ala Asp Thr Val Ile	
865 870 875 880	
atg aaa ccg tta aga gca agc atg att ggg gcg tgt ctg caa caa gtt	2688
Met Lys Pro Leu Arg Ala Ser Met Ile Gly Ala Cys Leu Gln Gln Val	
885 890 895	
ctc gag ctg aga aaa aca aga caa caa cat cca gaa gga tca tca ccc	2736
Leu Glu Leu Arg Lys Thr Arg Gln Gln His Pro Glu Gly Ser Ser Pro	
900 905 910	
gca act ctc aag agc ttg ctt aca ggg aag aag att ctt gtg gtt gat	2784
Ala Thr Leu Lys Ser Leu Leu Thr Gly Lys Lys Ile Leu Val Val Asp	
915 920 925	
gat aat ata gtt aac agg aga gta gct gca gga gct ctc aag aaa ttt	2832

Asp Asn Ile Val Asn Arg Arg Val Ala Ala Gly Ala Leu Lys Lys Phe
 930 935 940

gga gca gaa gtg gtt tgt gca gag agt ggt caa gtt gct ttg ggt ttg 2880
 Gly Ala Glu Val Val Cys Ala Glu Ser Gly Gln Val Ala Leu Gly Leu
 945 950 955 960

ctt cag att cca cac act ttc gat gct tgc ttc atg gat att caa atg 2928
 Leu Gln Ile Pro His Thr Phe Asp Ala Cys Phe Met Asp Ile Gln Met
 965 970 975

cca cag atg gac gga ttt gaa gca act cgt cag ata aga atg atg gag 2976
 Pro Gln Met Asp Gly Phe Glu Ala Thr Arg Gln Ile Arg Met Met Glu
 980 985 990

aag gaa gct aaa gag aag acg aat ctc gaa tgg cat tta ccg att cta 3024
 Lys Glu Ala Lys Glu Lys Thr Asn Leu Glu Trp His Leu Pro Ile Leu
 995 1000 1005

gcg atg act gcg gat gtg ata cac gcg acc tac gag gaa tgt ctg aaa 3072
 Ala Met Thr Ala Asp Val Ile His Ala Thr Tyr Glu Glu Cys Leu Lys
 1010 1015 1020

agt ggg atg gat ggt tac gtc tcc aaa cct ttt gaa gaa gag aat ctc 3120
 Ser Gly Met Asp Gly Tyr Val Ser Lys Pro Phe Glu Glu Glu Asn Leu
 1025 1030 1035 1040

tat aaa tcc gtt gcc aaa tca ttc aaa cct aat cct atc tca cct tcg 3168
 Tyr Lys Ser Val Ala Lys Ser Phe Lys Pro Asn Pro Ile Ser Pro Ser
 1045 1050 1055

tcg taa 3174
 Ser

<210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Descrição de sequência artificial iniciador de oligonucleotideo pro-
 jetado para PCR

<400> 3
 tcagatatga actgggcact caac

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial iniciador de oligonucleotideo projetado para PCR

<400> 4
 ctcaatgctt ttgttccttg actc

24

<210> 5
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial iniciador de oligonucleotideo projetado para PCR

<400> 5
 accatgaact gggcactcaa caatcatcaa g

31

<210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial iniciador de oligonucleotideo projetado para PCR

<400> 6
 ggattacgac gaaggtgaga taggattagg

30

<210> 7
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial iniciador de oligonucleotideo projetado para PCR

<400> 7

cgggatccat gaactgggca ctcaacaatc atc

33

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial iniciador de oligonucleotideo projetado para PCR

<400> 8

gctctagatt acgacgaagg tgagatagga ttag

34

REIVINDICAÇÕES

1. Agente capaz de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta que tem uma atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocina de uma célula derivada da planta.
- 5 2. Agente, de acordo com a reivindicação 1, em que o agente capaz de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta é um regulador de crescimento da planta.
3. Agente, de acordo com a reivindicação 1, em que o agente capaz de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta é um a-
10 gente capaz de controlar o crescimento de um corpo da planta.
4. Agente, de acordo com a reivindicação 1, em que o agente capaz de controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta um agente é capaz de controlar a diferenciação de uma célula da planta.
5. Agente, de acordo com a reivindicação 3, em que o agente
15 capaz de controlar o crescimento de uma planta é um agente capaz de controlar o crescimento de um broto de uma planta.
6. Agente, de acordo com a reivindicação 5, em que controle do crescimento de um broto de uma planta é inibição do crescimento de um broto axilar.
- 20 7. Agente, de acordo com a reivindicação 5, em que controle do crescimento de um broto de uma planta é inibição do crescimento de um broto de flor.
8. Agente, de acordo com a reivindicação 3, em que o agente capaz de controlar o crescimento de um tronco da planta é um agente capaz
25 de promover o estabelecimento de resistência de uma planta.
9. Agente, de acordo com a reivindicação 3, em que o agente capaz de controlar o crescimento de um tronco da planta é um agente capaz de promover o cultivo de uma planta.
10. Agente, de acordo com a reivindicação 3, em que o agente
30 capaz de controlar o crescimento de um tronco da planta é um agente capaz de promover o crescimento de uma raiz de uma planta.
11. Agente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1

a 10, em que o receptor de citocina de uma célula derivada da planta é um receptor de citocinina selecionado a partir do seguinte grupo A:

<Grupo A>

(a) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácido de
5 SEQ ID NO:1,

(b) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO:1 em que um ou mais aminoácidos são deletados, adicionados ou substituídos, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina,

10 (c) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido tendo uma identidade de sequência de 45% ou mais com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina

(d) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido
15 codificada pela sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2

(e) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada por um polinucleotídeo que hibridiza sob uma condição rigorosa com um polinucleotídeo complementar a um polinucleotídeo tendo a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina.
20

12. Agente, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que a atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocina de uma célula derivada da planta é uma atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina selecionado a partir do
25 seguinte grupo A em um sistema de contato de uma célula tendo o receptor de citocinina com uma substância tendo uma atividade agonística ao receptor de citocinina;

<Grupo A>

(a) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácido de
30 SEQ ID NO: 1,

(b) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 em que um ou mais aminoácidos são deletados, adiciona-

dos ou substituídos, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina,

(c) uma proteína que compreende uma sequência de aminoácido tendo uma identidade de sequência de 45% ou mais com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina

(d) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2

(e) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada por um polinucleotídeo que hibridiza sob uma condição rigorosa com um polinucleotídeo complementar a um polinucleotídeo tendo a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina.

13. Regulador de crescimento da planta compreendendo uma substância química capaz de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocina de uma célula derivada da planta, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo, como um ingrediente ativo.

14. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a reivindicação 13, em que a substância química tem uma atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina selecionado a partir do seguinte grupo A em um sistema de contato compreendendo uma célula tendo o receptor de citocinina, uma substância tendo uma atividade agonística ao receptor de citocinina, e a substância química;

<Grupo A>

(a) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1,

(b) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 em que um ou mais aminoácidos são deletados, adicionados ou substituídos, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina,

(c) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido tendo uma identidade de sequência de 45% ou mais com a sequência de

aminoácido de SEQ ID NO:1, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina

(d) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2

5 (e) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada por um polinucleotídeo que hibridiza sob uma condição rigorosa com um polinucleotídeo complementar a um polinucleotídeo tendo a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina.

10 15. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a reivindicação 14, em que a substância tendo uma atividade agonística ao receptor de citocinina é trans-zeatina.

15 16. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a reivindicação 13, em que a substância química tem uma atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina selecionado a partir do seguinte grupo A em um sistema de contato compreendendo uma célula tendo o receptor de citocinina, 0,6 ppm de trans-zeatina e 2 ppm da substância química, quando comparado com o caso onde a substância química não está presente no sistema de contato;

20 <Grupo A>

(a) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:1,

25 (b) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO:1 em que um ou mais aminoácidos são deletados, adicionados ou substituídos, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina,

30 (c) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido tendo uma identidade de sequência de 45% ou mais com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:1, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina

(d) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2

(e) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada por um polinucleotídeo que hibridiza sob uma condição rigorosa com um polinucleotídeo complementar a um polinucleotídeo tendo a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina.

17. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a reivindicação 13, em que a substância química tem uma atividade de inibir 90% ou mais de sinalização intracelular de um receptor de citocinina selecionado a partir do seguinte grupo A em um sistema de contato compreendendo uma célula tendo o receptor de citocinina, 0,6 ppm de trans-zeatina e 2 ppm da substância química, quando comparado com o caso onde a substância química não está presente no sistema de contato;

<Grupo A>

(a) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1,

(b) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 em que um ou mais aminoácidos são deletados, adicionados ou substituídos, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina,

(c) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido tendo uma identidade de sequência de 45% ou mais com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina

(d) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2

(e) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada por um polinucleotídeo que hibridiza sob uma condição rigorosa com um polinucleotídeo complementar a um polinucleotídeo tendo a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina.

18. Método por procurar uma substância química capaz de promover o crescimento de uma raiz de uma planta que compreende:

(1) uma primeira etapa de medir a quantidade de sinalização intracelular de um receptor de citocinina selecionado a partir do seguinte grupo A em um sistema de contato compreendendo uma célula tendo o receptor de citocinina, uma substância tendo uma atividade agonística ao receptor de citocinina e uma substância de teste; e

(2) uma segunda etapa de selecionar uma substância química capaz de promover o crescimento de uma raiz de uma planta com base em uma diferença obtida comparando-se a quantidade de sinalização intracelular medida na primeira etapa com a quantidade de sinalização intracelular na ausência da substância química;

<Grupo A>

(a) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1,

(b) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 em que um ou mais aminoácidos são deletados, adicionados ou substituídos, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina,

(c) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido tendo uma identidade de sequência de 45% ou mais com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:1, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina

(d) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2

(e) uma proteína compreendendo uma sequência de aminoácido codificada por um polinucleotídeo que hibridiza sob uma condição rigorosa com um polinucleotídeo complementar a um polinucleotídeo tendo a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, e tendo uma atividade de funcionamento como um receptor de citocinina.

19. Método de pesquisa, de acordo com a reivindicação 18, em que a célula tendo o receptor de citocinina é uma célula transformada em que um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeo codificando a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 é introduzido.

20. Método de pesquisa, de acordo com a reivindicação 18, em que a célula tendo o receptor de citocinina é uma célula de levedura transformada em que um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeo codificando a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 é introduzido.

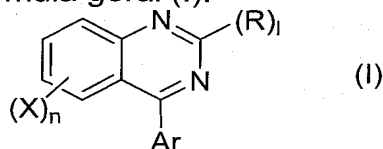
21. Método de pesquisa, de acordo com a reivindicação 18, 19 ou 20, em que a substância tendo uma atividade agonística ao receptor de citocinina é trans-zeatina.

22. Regulador de crescimento da planta compreendendo uma substância química selecionada pelo método de pesquisa como definido na reivindicação 18, 19, 20 ou 21, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo, como um ingrediente ativo.

23. Método de regulamento de crescimento da planta, que compreende aplicar uma quantidade eficaz do regulador de crescimento da planta, como definido na reivindicação 13 14, 15, 16, 17 ou 22 a uma planta ou a um *habitat* da planta.

24. Método de regulamento de crescimento da planta, que compreende determinar uma substância química capaz de promover o crescimento de uma raiz de uma planta pelo método de pesquisa de acordo com a reivindicação 18, 19, 20 ou 21, e apresentar a substância química capaz de promover o crescimento de uma raiz de uma planta desse modo determinada em contato com uma planta.

25. Regulador de crescimento da planta compreendendo um composto representado pela fórmula geral (I):



em que R e X são os mesmos ou diferentes e representam um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído, um grupo representado por NR^1R^2 , um grupo representado por OR^3 , um grupo representado por $S(O)_mR^4$, um grupo nitro ou um átomo de halogênio, em que R^1 representa um átomo de hidrogênio ou um grupo hidrocarboneto opcionalmente substi-

tuído,

R^2 representa um átomo de hidrogênio, um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído, um grupo representado por NR^5R^6 (em que R^5 e R^6 são os mesmos ou diferentes e representam um átomo de hidrogênio ou um grupo $C_1 - C_6$ alquila opcionalmente substituído) ou um grupo representado por OR^7 (em que R^7 representa um átomo de hidrogênio ou um grupo C_1-C_6 alquila opcionalmente substituído), ou R^1 e R^2 são empregados juntos com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados para formar um grupo amino cíclico opcionalmente substituído,

R^3 e R^4 cada qual representa um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído,

l representa um número inteiro de 0 a 1,

m representa um número inteiro de 0 a 2,

n representa um número inteiro de 0 a 4,

quando n for 2 ou mais, cada X é o mesmo ou diferente um do outro, e

Ar representa um grupo arila opcionalmente substituído ou um grupo heteroarila opcionalmente substituído; ou um sal agricolamente aceitável do mesmo, como um ingrediente ativo.

26. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a reivindicação 25, em que l é 1 e R é um grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído.

27. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a reivindicação 25, em que l é 1 e R é um grupo C_{1-3} alquila que é opcionalmente substituído com átomo(s) de halogênio ou grupo(s) oxo.

28. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a reivindicação 26, em que o grupo hidrocarboneto opcionalmente substituído é um grupo C_{1-3} alquila que é opcionalmente substituído com átomo(s) de halogênio ou grupo(s) oxo.

29. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a reivindicação 25, em que l é 1 e R é um grupo representado por NR^1R^2 .

30. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a rei-

vindicação 29, em que R^1 representa um átomo de hidrogênio ou um grupo C_{1-3} alquila, R^2 representa um átomo de hidrogênio, um grupo amino, um grupo C_{1-3} alquilamino, um grupo di C_{1-3} alquilamino, um grupo amidino, um grupo C_{1-3} alcóxi, um grupo fenila, um grupo C_{1-3} acila, um grupo C_{1-6} alquila, um grupo C_{3-6} alquenila ou um grupo C_{3-6} alquinila em que o grupo fenila é opcionalmente substituído com 1 a 3 grupos C_{1-3} alquila iguais ou diferentes, o grupo fenila, o grupo acila, o grupo alquila, o grupo alquenila e o grupo alquinila são opcionalmente substituídos com 1 a 3 os mesmos ou diferentes substituintes selecionados a partir de um átomo de halogênio, um grupo hidroxila, um grupo C_{1-3} alcóxi, um grupo hidróxi C_{1-3} alcóxi, um grupo carboxila, um grupo C_{1-3} alcoxicarbonila, um grupo carbamoila, um grupo amino, um grupo C_{1-3} alquilamino, um grupo di C_{1-3} alquilamino, um grupo mercapto, um grupo C_{1-3} aciltio, um grupo ciano, um grupo furila e um grupo tetra-hidrofurila, ou R^1 e R^2 são empregados juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados para formar um grupo pirrolidino, um grupo piperidino ou um grupo morfolino.

31. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a reivindicação 29, em que R^1 representa um átomo de hidrogênio, R^2 representa um átomo de hidrogênio, um grupo formila, um grupo C_{1-6} alquila, um grupo C_{3-6} alquenila ou um grupo C_{3-6} alquinila em que o grupo alquila, o grupo alquenila e o grupo alquinila são opcionalmente substituídos com (a) substituinte(s) selecionado(s) a partir de um grupo hidroxila, um grupo metóxi, um grupo metoxicarbonila, um grupo etoxicarbonila, um grupo ciano e um grupo furila.

32. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a reivindicação 25, em que I é 1 e R é um grupo representado por OR^3 .

33. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a reivindicação 32, em que R^3 é um grupo C_{1-3} alquila é opcionalmente substituído com um grupo amino.

34. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a reivindicação 25, em que I é 1 e R é um grupo representado por $S(O)_mR^4$.

35. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a rei-

vindicação 34, em que R^4 é um grupo C_{1-3} alquila que é opcionalmente substituído com um grupo amino ou um grupo hidroxila, e m é 0.

36. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a reivindicação 25, em que I é 1 e R é um átomo de halogênio.

5 37. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a reivindicação 36, em que o átomo de halogênio é um átomo de cloro.

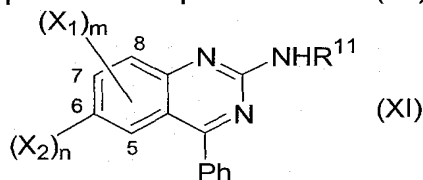
38. Regulador de crescimento da planta, de acordo com qualquer uma dentre as reivindicações 25 a 37, em que n é de 1 a 2 e X é um grupo C_{1-3} alquila, um grupo C_{1-3} alcóxi, um grupo C_{1-3} haloalquila, um grupo ciano, um átomo de halogênio ou um grupo nitro.

39. Regulador de crescimento da planta, de acordo com a reivindicação 38, em que X é um átomo de cloro, um átomo de bromo ou um grupo nitro, e X está na posição 6 e/ou na posição 8.

40. Regulador de crescimento da planta, de acordo com qualquer uma dentre as reivindicações 25 a 39, em que Ar é um grupo fenila que é opcionalmente substituído com (a) átomo(s) de halogênio ou (a) grupo(s) C_{1-3} alquila.

41. Método de regulamento de crescimento da planta, que compreende aplicar uma quantidade eficaz do regulador de crescimento de planta como definido em qualquer uma dentre as reivindicações 25 a 40 a uma planta ou a um *habitat* da planta.

42. Composto representado pela fórmula (XI) :



em que Ph representa um grupo fenila, R^{11} representa um átomo de hidrogênio, um grupo formila, um grupo C_{1-6} alquila, um grupo C_{3-6} alquênica ou um grupo C_{3-6} alquinila em que o grupo alquila, o grupo alquênica e o grupo alquinila são opcionalmente substituídos com pelo menos um substituinte selecionado a partir de um grupo hidroxila, um grupo C_{1-3} alcóxi, um grupo C_{1-3} alcóxicarbonila, um grupo ciano, um grupo 2-furila e um grupo 2-tetra-hidrofurila,

m representa um número inteiro de 0 a 3,

n representa um número inteiro de 0 a 1,

pelo menos um dentre m e n não é 0,

5 X_1 e X_2 são os mesmos ou diferentes e representam um átomo de cloro, um átomo de bromo, um grupo trifluorometila, um grupo ciano ou um grupo nitro,

quando m for 2 ou mais, cada X_1 é o mesmo ou diferente um do outro; contanto que

10 a) quando m for 1, X_1 seja um átomo de 5-cloro ou um átomo de 7-cloro e R^{11} represente um grupo metila, n represente um número inteiro de 1, ou

b) quando n for 1 e qualquer uma das condições (1) a (3) for satisfeita, m represente um número inteiro de 1 a 3:

15 (1) X_2 é um átomo de cloro, e R^{11} é um grupo selecionado a partir de um átomo de hidrogênio, um grupo metila, um grupo 2-hidroxietila, um grupo 3-hidroxipropila, um grupo 2,2-dimetoxietila e um grupo cianometila,

(2) X_2 é um átomo de bromo, e R^{11} é um grupo selecionado a partir de um grupo 2-hidroxietila, um grupo 3-hidroxipropila e um grupo 2-metoxietila, e

20 (3) X_2 é um grupo nitro, e R^{11} é um grupo 3-hidroxipropila; ou um sal agricolamente aceitável do mesmo.

43. Composto, de acordo com a reivindicação 42, em que R^{11} representa um átomo de hidrogênio, um grupo formila, um grupo metila, um grupo etila, um grupo 2-hidroxietila, um grupo 2-metoxietila, um grupo furfu-
25 rila, um grupo metoxycarbonilmetila ou um grupo etoxycarbonilametila, m é 0, n é 1, e X_2 é um átomo de cloro ou um grupo nitro, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo.

44. Composto, de acordo com a reivindicação 42, em que R^{11} representa um átomo de hidrogênio, um grupo formila, um grupo metila, um
30 grupo etila, um grupo 2-hidroxietila, um grupo 3-hidroxipropila, um grupo 2-metoxietila, um grupo furfurila, um grupo metoxycarbonilmetila ou um grupo etoxycarbonilametila, m é 1, n é 1, X_1 é um átomo de 8-cloro, e X_2 representa

um átomo de cloro ou um grupo nitro, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo.

45. Composto, de acordo com a reivindicação 42, em que m é que um número inteiro de 1 a 3 e n é 0, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo.

46. Composto, de acordo com a reivindicação 42, em que R^{11} representa um grupo formila, um grupo C_{4-6} alquila, um grupo C_{3-6} alquenila ou um grupo C_{3-6} alquinila em que o grupo alquila, grupo alquenila e grupo alquinila são opcionalmente substituídos com (a) grupo(s) hidroxila ou (a) grupo(s) C_{1-3} alcóxi, ou R^{11} representa um grupo C_{1-3} alcóxicarbonilmetila, um grupo C_{1-3} alcóxi C_{1-3} alquila ou um grupo furfurila,

m é 0,

n é 1, e

X_2 é um átomo de cloro, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo.

47. Composto, de acordo com a reivindicação 42, em que n é 1, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo.

48. Composto, de acordo com a reivindicação 42, em que m é 1 a 3 e n é 1, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo.

49. Composto, de acordo com a reivindicação 42, 45, 47 ou 48, em que R^{11} é que um grupo C_{1-3} alcóxicarbonilmetila ou um grupo furfurila, ou um sal agricolamente aceitável do mesmo.

50. Composto, de acordo com a reivindicação 42, em que n é 1 e X_2 é um grupo trifluorometila ou um grupo ciano.

FIG. 1

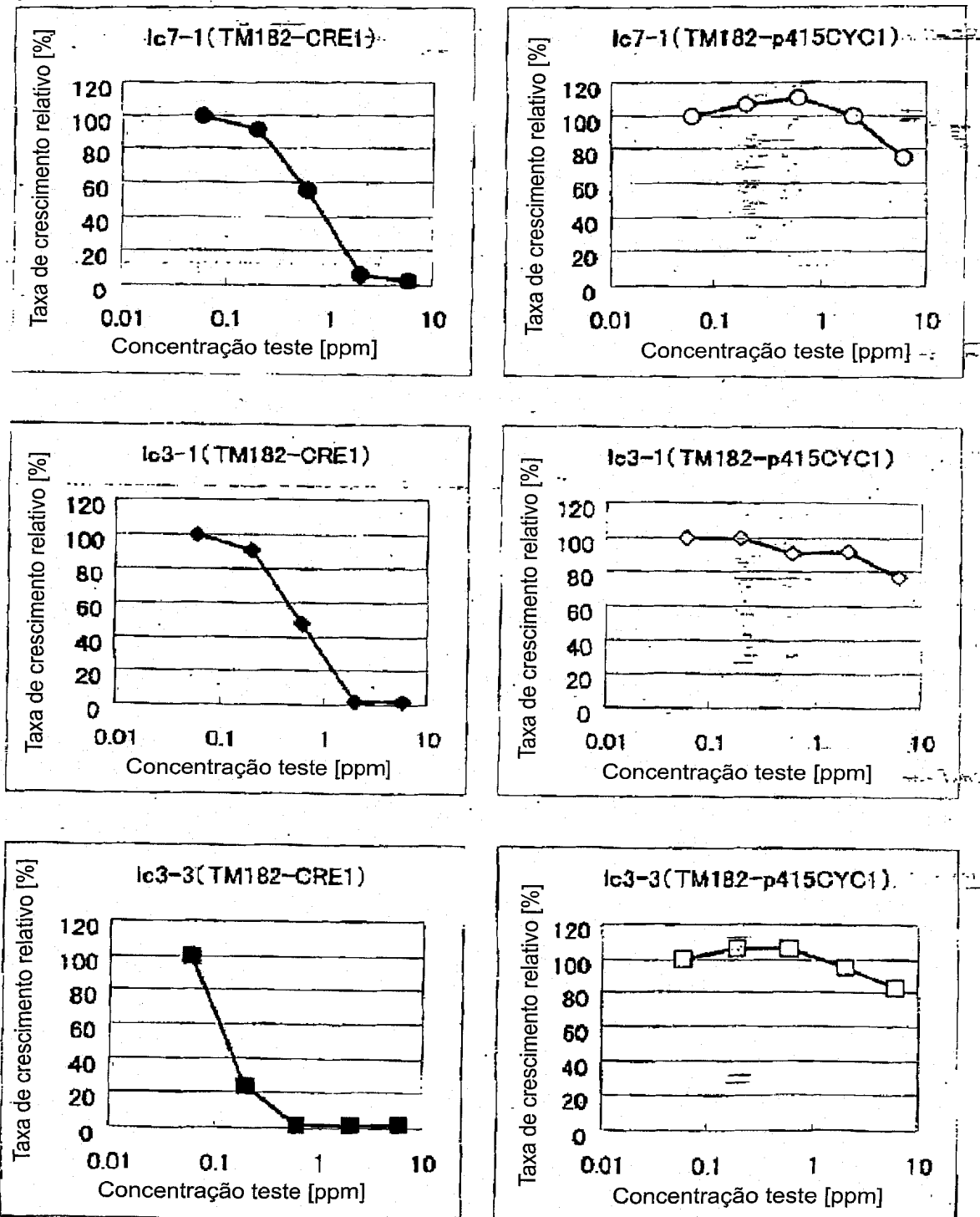


FIG. 2

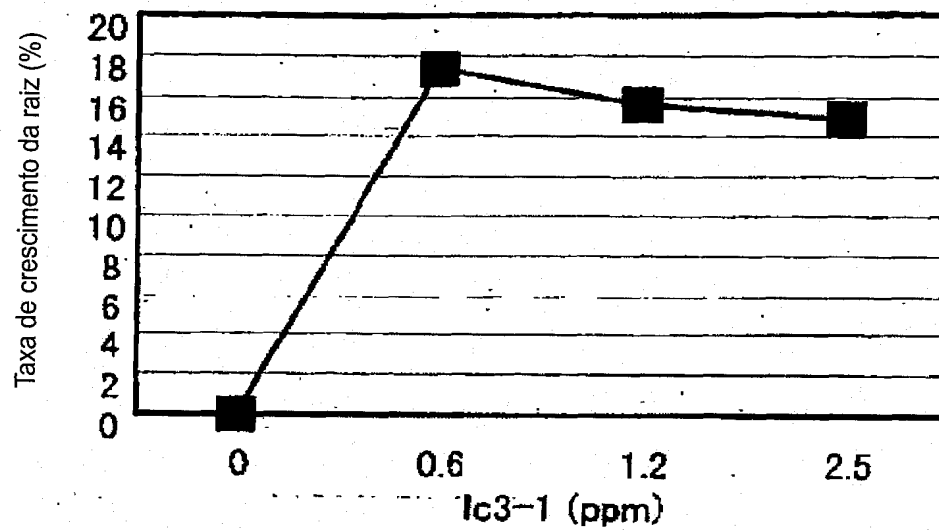


FIG. 3

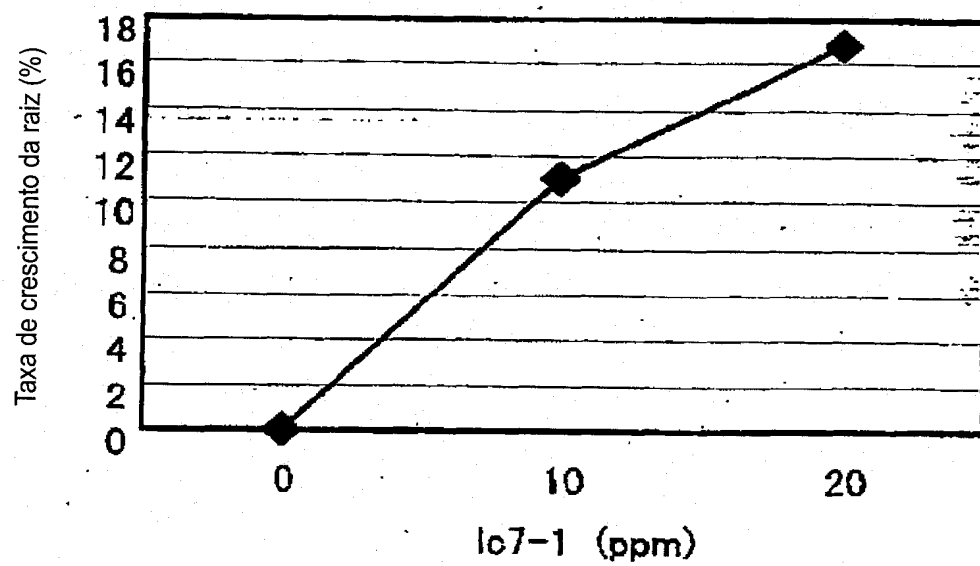


FIG. 4

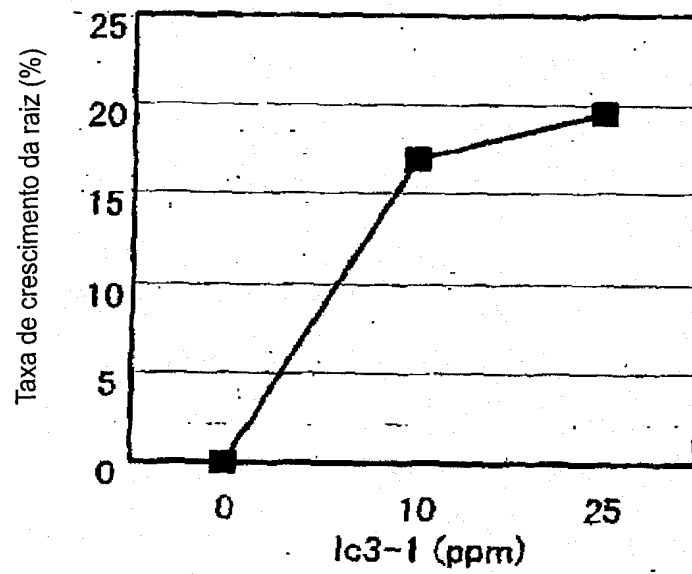


FIG. 5

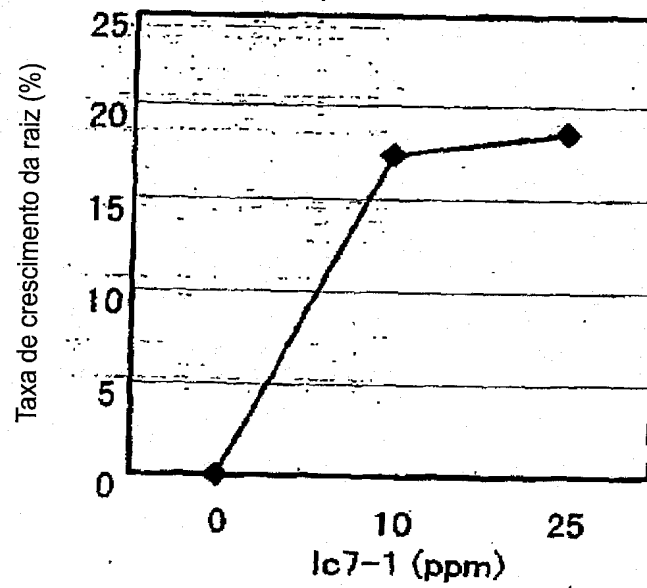


FIG. 6

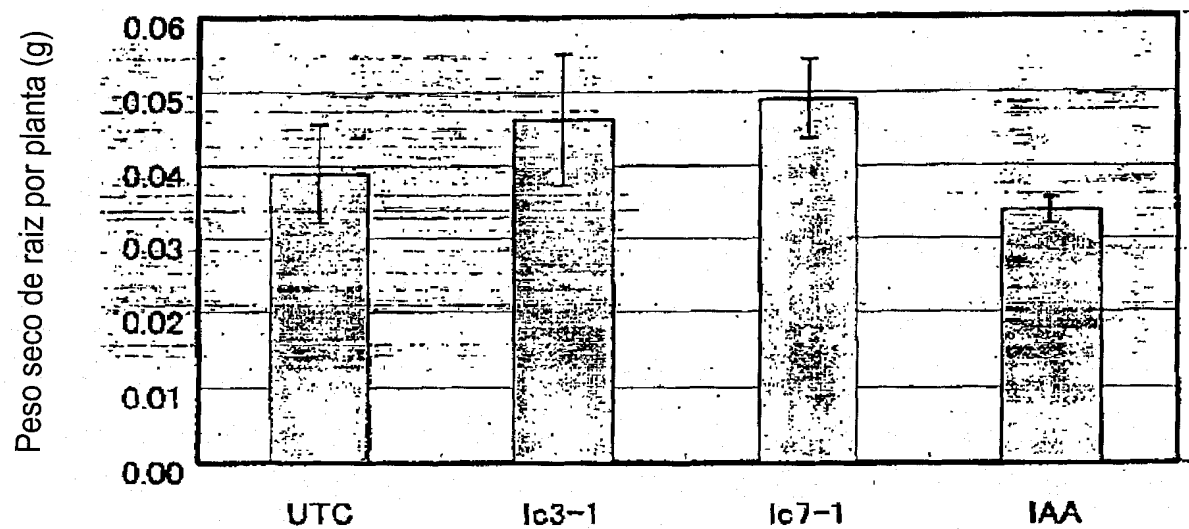


FIG. 7

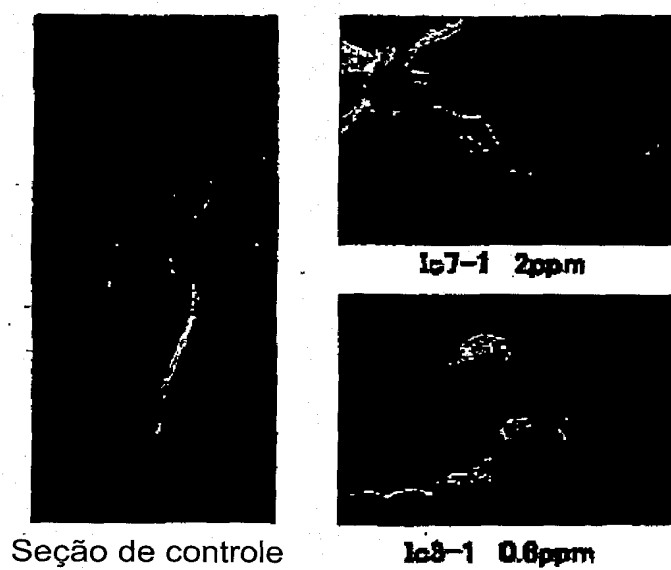
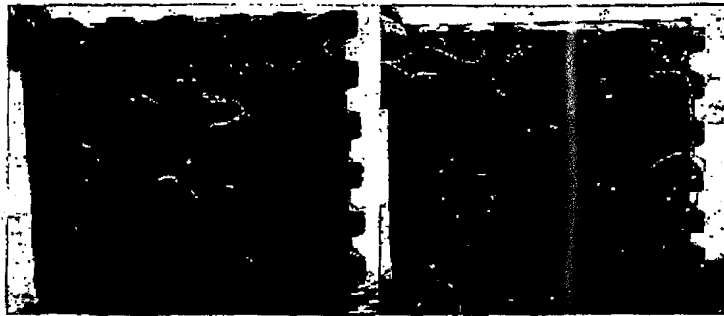


FIG. 8



UTC

10ppm
Ic3-3

FIG. 9

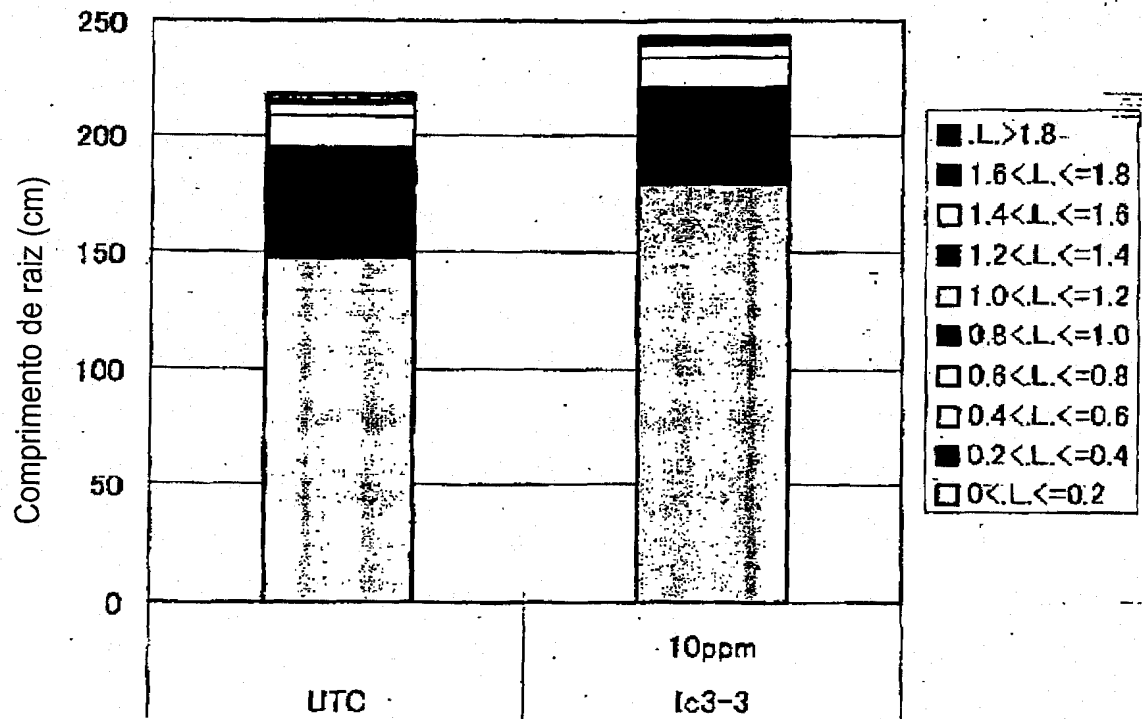


FIG. 10

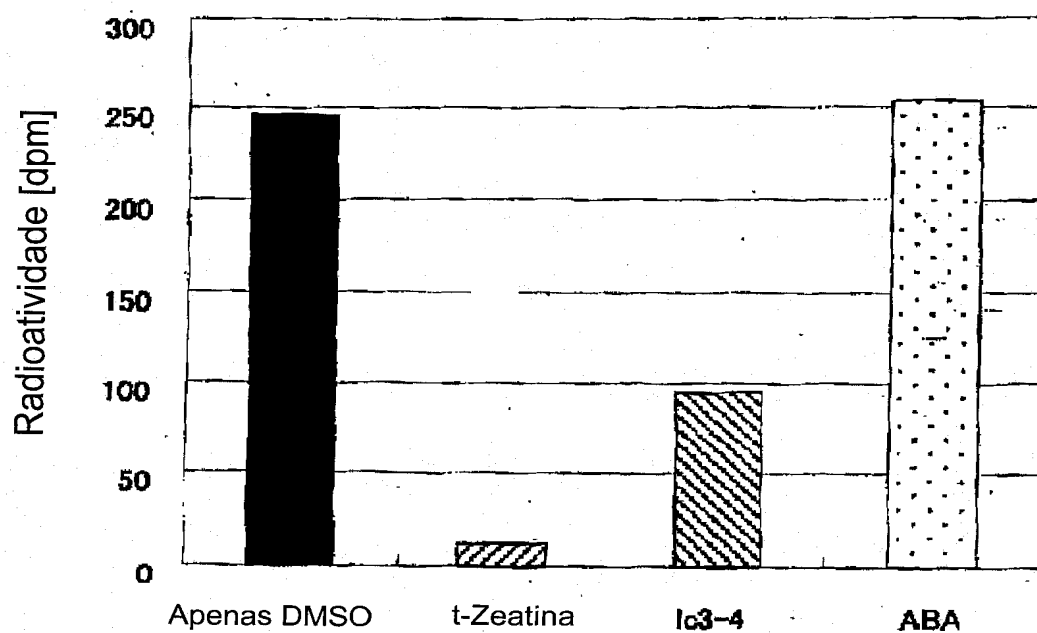
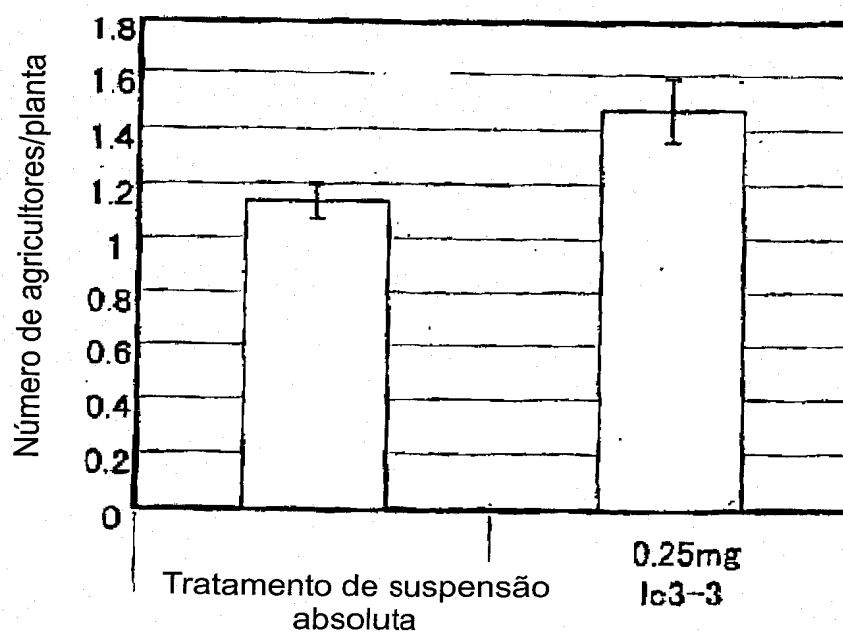


FIG. 11



RESUMO

Patente de Invenção: **"AGENTE PARA INIBIR A SINALIZAÇÃO DE CITOCININA"**.

5 A presente invenção refere-se a uma substância que tem uma atividade de inibir a sinalização intracelular de um receptor de citocinina derivado da planta e que pode controlar o crescimento ou diferenciação de uma planta. Descreve-se também um método para pesquisar uma substância química capaz de promover o crescimento de uma raiz de uma planta, que compreende medir o nível de sinalização intracelular do receptor em um

10 sistema onde uma célula tendo o receptor é contatada com uma substância química tendo uma atividade agonística no receptor e uma substância a ser testada, comparar o nível de sinalização intracelular medido na etapa anterior com um nível de sinalização intracelular medido na ausência da substância química, e determinar a substância química como sendo uma substância química capaz de promover o crescimento de uma raiz de uma

15 planta com base na diferença obtida pela comparação; e outros.