

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

(21) **PI0709801-4 A2**

(22) Data de Depósito: 29/03/2007
(43) Data da Publicação: 26/07/2011
(RPI 2116)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/43 2006.01
C12N 15/82 2006.01

(54) Título: **POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, CASSETTE DE EXPRESSÃO, MÉTODO PARA MODULAR O TAMANHO DE ÓRGÃOS SEM PLANTAS, MÉTODO DE MODULAR TODA A PLANTA OU O TAMANHO DE ÓRGÃO EM UMA PLANTA, PRODUTO**

(57) Resumo: POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, CASSETTE DE EXPRESSÃO, MÉTODO PARA MODULAR O TAMANHO DE ÓRGÃOS EM PLANTAS, MÉTODO DE MODULAR TODA A PLANTA OU O TAMANHO DE ÓRGÃO EM UMA PLANTA, PRODUTO A presente invenção fornece polinucleotídeos e peptídeos relacionados com a família do gene ZmARGOS. A presente provê ainda a sequência genômica para genes ZmARGOS. ZmARGOS é responsável por controlar o crescimento da planta, o tamanho de órgãos e o rendimento em culturas agrícolas.

(30) Prioridade Unionista: 31/03/2006 US 60/788,123

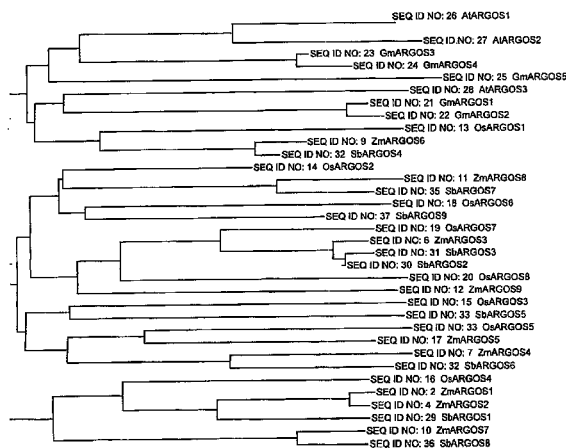
(73) Titular(es): Pioneer Hi - Bred International, Inc

(72) Inventor(es): Carl R. Simmons, Mei Guo, Rajeev Gupta, Wesley Bruce

(74) Procurador(es): Antonella Carminatti

(86) Pedido Internacional: PCT US2007065444 de 29/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/115064 de 11/10/2007



POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, CASSETE DE EXPRESSÃO, MÉTODO PARA MODULAR O TAMANHO DE ÓRGÃOS EM PLANTAS, MÉTODO DE MODULAR TODA A PLANTA OU O TAMANHO DE ÓRGÃO EM UMA PLANTA, PRODUTO

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção está relacionada, de forma geral, ao campo da biologia molecular.

10 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A domesticação de várias plantas se correlacionou com aumentos dramáticos em produção. A maioria das variações fenotípicas ocorrendo em populações naturais é contínua e é
15 efetuada por influência de múltiplos genes. A identificação de genes específicos responsáveis pelas dramáticas diferenças em produção, em plantas domesticadas, se tornou um foco importante da pesquisa agrícola.

20 Em *Arabidopsis*, uma família de genes associados com mudanças vegetais que se relacionam a rendimento melhorado em cultivares, o gene regulado por auxina envolvido em tamanho de órgão (Auxin-Regulated Gene involved in Organ Size - ARGOS) é induzido por auxina. Esse gene é
25 responsável pela regulação de proliferação celular e crescimento de órgãos. O ARGOS de *Arabidopsis* é expresso

naturalmente em um nível baixa em vários tecidos jovens incluindo raízes, caules de inflorescências, flor, folhas jovens de rosetas e siliquas, mas indetectável em folhas maduras. Em estudos por Hu, et al. (2003 *Plant Cell* 15:1951-61) e Hu, et al. (2006 *The Plant Journal* 47(1):1-9), plantas transgênicas que ectopicamente super-expressam cDNA de ARGOS senso ou anti-senso apresentam órgãos aéreos crescidos ou reduzidos, respectivamente. Alteração em tamanho de órgão demonstrado nessas plantas é associada com mudanças no número de células, e não em tamanho celular. O maior número de células é atribuído à duração do crescimento de órgão em *Arabidopsis*.

A presente invenção inclui a identificação dos genes ARGOS putativos de milho, ZmARGOS 1-9 (SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 40-45 e 71) que são relacionados aos genes ARGOS de *Arabidopsis* (SEQ ID NOS: 59, 60 e 61). O ortólogo tendo a maior similaridade a ARGOS *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 59), é ZmARGOS 1 (SEQ ID NO: 1). A expressão de ZmARGOS1 e 2 (SEQ ID NOS: 1 e 3) em milho foi primariamente nas raízes, endosperma inicial, espiga imatura e meristemas inflorescentes de broto e de espiga. A expressão está associada com tecidos crescendo ativamente, e é vista em um grau menor em tecidos maduros. Essa descoberta é consistente com o efeito positivo notado do gene em regular

o crescimento e proliferação celular. O gene ZmARGOS 3 (SEQ ID NO: 5) expresso em um amplo espectro de tecidos e estágios de desenvolvimento.

5 Plantas transgênicas expressando ZmARGOS1 (SEQ ID NO: 1) mostram um impacto positivo em acúmulo de biomassa e taxa de crescimento de planta de milho, assim como um aumento em tamanho de órgão. Esses genes de milho serão úteis para intensificar características agronômicas em
10 milho (e outros cultivares).

A presente invenção também inclui a identificação de genes ARGOS em outras espécies vegetais. A família de genes de arroz é representada por 8 membros da família.
15 Nove membros da família de genes foram encontrados em *Sorghum bicolor*. Cinco seqüências gênicas também foram encontradas em Soja (*Glycine max*). Três membros da família de genes ARGOS de *Arabidopsis* são aqui descritos.

20 **BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

Composições e métodos para controlar o crescimento vegetal e tamanho de órgão para produção crescente em uma planta são providos. As composições incluem seqüências de
25 ARGOS de milho, soja, *Arabidopsis*, arroz e sorgo.

Composições da invenção compreendem seqüências de aminoácidos e seqüências de nucleotídeos selecionadas de SEQ ID NOS: 1-37, 40-71 assim como variantes e fragmentos dessas.

5

Polinucleotídeos codificando as seqüências de ARGOS são providos em construções de DNA para expressão em uma planta de interesse. São ainda providos cassetes de expressão, plantas, células vegetais, partes de planta, e
10 sementes compreendendo as seqüências da invenção. Em avanços específicos, o polinucleotídeo é operacionalmente ligado a um promotor constitutivo.

Métodos para modular o nível de uma seqüência ARGOS em
15 uma planta ou parte de planta são providos. Os métodos compreendem introduzir em uma planta ou parte de planta um polinucleotídeo heterólogo compreendendo uma seqüência ARGOS da invenção. O nível de polipeptídeo ARGOS pode ser aumentado ou diminuído. Tal método pode ser usado para
20 aumentar o rendimento em plantas; em um avanço, o método é usado para aumentar o rendimento de grãos em cereais.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1: Dendrograma ilustrando a relação entre os polipeptídeos ARGOS desta invenção de várias espécies vegetais: milho, arroz, soja, sorgo e *Arabidopsis*.

5 Figura 2: Alinhamento de seqüências polipeptídicas de milho, arroz, soja, sorgo e *Arabidopsis* com identificação de regiões conservadas. As proteínas possuem uma região bem conservada rica em prolina próxima ao C-terminal. As regiões N-terminal são geralmente divergentes. As
10 proteínas são bem curtas, variando de 58 a 146, e com média de 110 aminoácidos.

Figura 3: Alinhamento de ZmARGOS 1, 2, e 3, com AtARGOS 1, destacando suas áreas de consenso, e
15 substituições conservadas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A menos que definido de outra forma, todos os termos
20 técnicos e científicos aqui usados possuem o mesmo significado como comumente entendido por alguém de conhecimento ordinário na técnica a qual esta invenção pertence. A menos que mencionado de outra forma, as técnicas aqui empregadas ou contempladas são metodologias
25 padrão bem conhecidas de alguém de conhecimento ordinário

na técnica. Os materiais, métodos e exemplos são ilustrativos apenas e não limitantes. O seguinte é apresentado por meio de ilustração e não pretende limitar o escopo da invenção.

5

A presente invenção será agora descrita mais completamente daqui em diante com referência aos desenhos que a acompanham, nos quais alguns, mas não todos os avanços da invenção são apresentados. De fato, essas invenções podem ser incorporadas de várias formas diferentes e não deveriam ser construídas como limitadas aos avanços aqui apresentados; ao contrário, esses avanços são providos de forma que esta descrição satisfaça requerimentos legais aplicáveis. Números similares referem-se a elementos similares, por conseguinte.

15

Várias modificações e outros avanços da invenção aqui apresentada virão à mente de um especialista na técnica a qual essas invenções pertencem, tendo o benefício dos ensinamentos apresentados nas descrições precedentes e desenhos associados. Portanto, deve ser entendido que as invenções não devem estar limitadas aos avanços específicos descritos e que modificações e outros avanços devem ser incluídos no escopo das reivindicações em anexo. Apesar de termos específicos serem aqui empregados, eles são usados

25

em um senso genérico e descritivo apenas, e não para propósitos de limitação.

A prática da presente invenção empregará, a menos que
5 indicado ao contrário, técnicas convencionais de botânica, microbiologia, cultura de tecidos, biologia molecular, química, bioquímica e tecnologia de DNA recombinante, que estão dentro da especialidade da técnica. Tais técnicas são explicadas completamente na literatura. Ver, e.g.,
10 Langenheim and Thimann, BOTANY: PLANT BIOLOGY AND ITS RELATION TO HUMAN AFFAIRS, John Wiley (1982); CELL CULTURE AND SOMATIC CELL GENETICS OF PLANTS, vol. 1, Vasil, ed. (1984); Stanier, et al., THE MICROBIAL WORLD, 5th ed., Prentice-Hall (1986); Dhringra and Sinclair, BASIC PLANT
15 PATHOLOGY METHODS, CRC Press (1985); Maniatis, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (1982); DNA CLONING, vols. I and II, Glover, ed. (1985); OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS, Gait, ed. (1984); NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION, Hames and Higgins, eds. (1984); e a série METHODS IN
20 ENZYMOLOGY, Colowick and Kaplan, eds, Academic Press, Inc., San Diego, CA.

Unidades, prefixos, e símbolos podem estar denotados na sua forma SI aceita. A menos que indicado ao contrário,
25 ácidos nucléicos são escritos da esquerda para a direita na

orientação 5' a 3'; seqüências de aminoácidos são escritas da esquerda para a direita na orientação amino para carboxi, respectivamente. Amplitudes numéricas incluem os números definindo a variação. Aminoácidos podem ser aqui
5 referidos tanto por seu símbolo de três letras comumente conhecido ou pelos símbolos de uma letra recomendados pela comissão de nomenclatura da *IUPAC-IUB* (Biochemical Nomenclature Commission). Nucleotídeos, da mesma forma, podem ser referidos por seus códigos de uma letra comumente
10 aceitos. Os termos definidos abaixo são definidos mais completamente por referência à especificação como um todo.

Ao descrever a presente invenção, os seguintes termos serão empregados, e devem ser definidos como indicados
15 abaixo.

Por "micróbio" pretende-se qualquer microorganismo (incluindo tanto microorganismos eucariontes ou procariontes), tais como fungos, leveduras, bactérias,
20 actinomicetos, algas e protozoários, assim como outras estruturas unicelulares.

Por "amplificado" pretende-se a construção de múltiplas cópias de uma seqüência de ácidos nucléicos ou
25 múltiplas cópias complementares à seqüência de ácidos

nucléicos usando pelo menos uma das seqüências de ácidos
nucléicos como modelo. Sistemas de amplificação incluem o
sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR), sistema de
reação em cadeia da ligase (LCR), amplificação baseada em
5 seqüência de ácidos nucleicos (NASBA, Cangene, Mississauga,
Ontario), sistemas Q-Beta Replicase, sistema de
amplificação baseado em transcrição (TAS), e amplificação
de deslocamento de fita (SDA). Ver, e.g., DIAGNOSTIC
MOLECULAR MICROBIOLOGY: PRINCIPLES AND APPLICATIONS,
10 Persing, et al., eds., American Society for Microbiology,
Washington, DC (1993). O produto de amplificação é chamado
de *amplicon*.

O termo "variantes modificados conservadamente" se
15 aplica tanto a seqüências de aminoácido e de ácidos
nucléicos. Com respeito a seqüências de ácidos nucleicos
em particular, variantes modificados conservadamente
referem-se àqueles ácidos nucleicos que codificam variantes
idênticos ou modificados conservadamente das seqüências de
20 aminoácidos. Por causa da degeneração do código genético,
um grande número de ácidos nucleicos funcionalmente
idênticos codifica qualquer dada proteína. Por exemplo, os
códon GCA, GCC, GCG e GCU todos codificam o aminoácido
alanina. Assim, em cada posição onde uma alanina é
25 especificada por um códon, o códon pode ser alterado para

qualquer dos códons correspondentes descritos sem alterar o polipeptídeo codificado. Tais variações em ácidos nucleicos são "variações silenciosas" e representam uma espécie de variação modificada conservadamente. Cada

5 sequência de ácidos nucleicos aqui que codifica um polipeptídeo também descreve cada variação silenciosa possível do ácido nucleico. Alguém de conhecimento ordinário reconhecerá que cada códon em um ácido nucleico (exceto AUG, que é ordinariamente o único códon para

10 metionina; uma exceção é *Micrococcus rubens*, para o qual GTG é o códon de metionina (Ishizuka, et al., (1993) *J. Gen. Microbiol.* 139:425-32) pode ser modificado para produzir uma molécula funcionalmente idêntica. Dessa forma, cada variação silenciosa de um ácido nucleico, o

15 qual codifica um polipeptídeo da presente invenção, está implícita em cada sequência polipeptídica descrita e incorporada aqui por referência.

Como para seqüências de aminoácidos, um especialista

20 reconhecerá que substituições, deleções ou adições individuais para um ácido nucleico, peptídeo, polipeptídeo, ou seqüência de proteínas que alterem, adicionem ou deletem um único aminoácido ou uma pequena porcentagem de aminoácidos na seqüência codificada são "variantes

25 modificados conservadamente" quando a alteração resulta na

substituição de um aminoácido por um aminoácido quimicamente similar. Assim, qualquer número de resíduos de aminoácidos selecionado do grupo de número inteiros consistindo de 1 a 15 pode ser, assim, alterados. Assim, 5 por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 7 ou 10 alterações podem ser feitas. Variantes modificados conservadamente provêm, tipicamente, similar atividade biológica como a sequência polipeptídica não modificada a partir da qual eles são derivados. Por exemplo, especificidade de substrato, 10 atividade enzimática, ou ligação ligante/receptor é de geralmente pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%, preferencialmente 60-90% da proteína nativa para seu substrato nativo. Tabelas de substituições conservadas provendo aminoácidos funcionalmente similares são bem 15 conhecidas na técnica.

O seis grupos a seguir contêm, cada, aminoácidos que são substituições conservadas um para o outro:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 20 2) Ácido Aspártico (D), Ácido Glutâmico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); e
- 25 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W).

Ver também, Creighton, PROTEINS, W.H. Freeman and Co. (1984).

Como aqui usado, "consistindo essencialmente de" significa a inclusão de seqüências adicionais a um polinucleotídeo objeto onde as seqüências adicionais não hibridizam seletivamente, sob condições de hibridização estringentes, ao mesmo cDNA que o polinucleotídeo e onde as condições de hibridização incluem uma etapa de lavagem em 0,1X SSC e 0,1% de sódio dodecil sulfato a 65°C.

Por "codificando" ou "codificado", com respeito a um ácido nucléico especificado, pretende-se compreender a informação para tradução na proteína especificada. Um ácido nucléico codificando uma proteína pode compreender seqüências não traduzidas (e.g., íntrons) em regiões traduzidas do ácido nucléico, ou podem não possuir tais seqüências não traduzidas intervenientes (e.g., como em cDNA). A informação pela qual uma proteína é codificada é especificada pelo uso de códons. Tipicamente, a seqüência de aminoácidos é codificada pelo ácido nucléico usando o código genético "universal". Contudo, variantes do código universal, tal como é presente em algumas mitocôndrias de plantas, animais, e fungos, a bactéria *Mycoplasma capricolum* (Yamao, et al., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 82:2306-9), ou o ciliado *Macronucleus*, podem ser usados quando o ácido nucléico é expresso usando esses organismos.

Quando o ácido nucléico é preparado ou alterado
5 sinteticamente, pode-se tomar vantagem de preferências de
códon conhecidas do hospedeiro visado onde o ácido nucléico
deve ser expresso. Por exemplo, apesar de seqüências de
ácidos nucléicos da presente invenção poderem ser expressas
tanto em espécies de plantas monocotiledôneas e
10 dicotiledôneas, seqüências podem ser modificadas para
contabilizar as preferências de códon específicas e
preferências de conteúdo GC de plantas monocotiledôneas ou
plantas dicotiledôneas, já que essas preferências foram
vistas por diferirem (Murray, et al., (1989) *Nucleic Acids*
15 *Res.* 17:477-98 e aqui incorporada por referência). Assim,
o códon preferido de milho para um aminoácido em particular
deve ser derivado de seqüências gênicas conhecidas de
milho. O uso de códon em milho para 28 genes de plantas de
milho é listado na Tabela 4 de Murray, et al., *supra*.

20

Como aqui usado, "heterólogo" em referência a um ácido
nucléico é um ácido nucléico que se origina de uma espécie
estrangeira, ou, se da mesma espécie, é substancialmente
modificado de sua forma nativa em composição e/ou lócus
25 genômico por intervenção humana deliberada. Por exemplo,

um promotor operacionalmente ligado a um gene estrutural heterólogo é de uma espécie diferente daquela da qual o gene estrutural foi derivado ou, se da mesma espécie, um ou ambos são substancialmente modificados se sua forma original. Uma proteína heteróloga pode ser originar de uma espécie estrangeira ou, se da mesma espécie, ser substancialmente modificada de sua forma original por intervenção humana deliberada.

10 Por "célula hospedeira" pretende-se uma célula, a qual contém um vetor e suporta a replicação e/ou expressão do vetor de expressão. Células hospedeiras podem ser células procariontes, tais como células de *E. coli*, ou células eucariontes, tais como leveduras, células de insetos, 15 plantas, anfíbios, ou de mamíferos. Preferencialmente, células hospedeiras são células vegetais monocotiledôneas ou dicotiledôneas, incluindo, mas não se limitando a, milho, sorgo, girassol, soja, trigo, alfafa, arroz, algodão, canola, cevada, milhete e tomate. Uma célula 20 hospedeira de monocotiledônea particularmente preferida é uma célula hospedeira de milho.

O termo "complexo de hibridização" inclui referência a uma estrutura *duplex* de ácido nucléico formada por duas 25 seqüências de ácidos nucléicos de fita simples

seletivamente hibridizadas uma à outra.

O termo "introduzido", no contexto de inserir um ácido nucléico em uma célula, significa a "transfecção" ou "transformação" ou "transdução" e inclui referência à incorporação de um ácido nucléico em uma célula eucarionte ou procarionte, onde o ácido nucléico pode ser incorporado no genoma da célula (e.g., DNA cromossômico, de plasmídeo, de plastídeo ou mitocondrial), convertido em um *replicon* autônomo, ou expresso transientemente (e.g., mRNA transfetado).

O termo "isolado" refere-se a material, tal como um ácido nucléico ou uma proteína, que é substancialmente ou essencialmente livre de componentes que normalmente acompanham ou interagem com o mesmo, como encontrado em seu ambiente naturalmente ocorrente. O material isolado compreende, opcionalmente, material não encontrado com o material em seu ambiente natural. Ácidos nucléicos, que são "isolados", como aqui definido, são também referidos como ácidos nucléicos "heterólogos". A menos que declarado de outra forma, o termo "ácido nucléico de ARGOS" significa um ácido nucléico compreendendo um polinucleotídeo ("polinucleotídeo ARGOS") codificando um polipeptídeo ARGOS.

Como aqui usado, "ácido nucléico" inclui referência a polímero de desoxirribonucleotídeo ou ribonucleotídeo tanto na forma de fita simples ou dupla-fita, e a menos que
5 limitado ao contrário, engloba análogos conhecidos tendo a natureza essencial de nucleotídeos naturais já que hibridizam a ácidos nucléicos de fita simples de maneira similar a nucleotídeos naturalmente ocorrentes (e.g., ácidos nucléicos peptídicos).

10

Por "biblioteca de ácidos nucléicos" pretende-se uma coleção de DNA isolado ou moléculas de RNA, que compreendem e representam substancialmente toda a fração transcrita de um genoma de um organismo especificado. A construção de
15 bibliotecas de ácidos nucléicos exemplares, tais como bibliotecas de DNA genômico e cDNA, é ensinada em referências padrão de biologia molecular, tais como Berger and Kimmel, GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES, da série METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 152, Academic Press, Inc., San
20 Diego, CA (1987); Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd ed., vols. 1-3 (1989); e CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, et al., eds, Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc.
25 (1994 Supplement).

Como aqui usado "operacionalmente ligado" inclui referência a uma ligação funcional entre uma primeira sequência, tal como um promotor e uma segunda sequência, 5 caracterizado pelo fato de que a sequência promotora inicia e media a transcrição da sequência de DNA correspondente à segunda sequência. Geralmente, operacionalmente ligado significa que as sequências de ácidos nucléicos sendo ligadas são contíguas e, onde necessário para juntar duas 10 regiões codificadoras de proteína, contíguas e na mesma fase de leitura.

Como aqui usado, o termo "planta" inclui referência a plantas inteiras, órgãos vegetais (e.g., folhas, caules, 15 raízes, etc.), sementes e células vegetais e progênie da mesma. Célula vegetal, como aqui usado inclui, sem limitação, culturas em suspensão de sementes, embriões, regiões meristemáticas, tecido de calo, folhas, raízes, brotos, gametófitos, esporófitos, pólen, e micrósporos. A 20 classe de plantas, que pode ser usada nos métodos da invenção, é geralmente tão ampla como a classe de plantas superiores passíveis e técnicas de transformação, incluindo tanto plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas incluindo espécies dos gêneros: *Cucurbita*, *Rosa*, *Vitis*, *Juglans*, 25 *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*,

Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot,
Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa,
Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana,
Solanum, Petunia, Digitalis, Majorana, Ciahorium,
 5 *Helianassim, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum,*
Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panieum, Pennisetum,
Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browaalia,
Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Avena, Hordeum,
Secale, Allium, e Triticum. Uma planta particularmente
 10 preferira é *Zea mays*.

Como aqui usado, "rendimento" inclui referência a
 alqueires por acre de um grão de cultivo na colheita, como
 ajustado para umidade de grãos (15% tipicamente). A
 15 umidade de grãos é medida no grão na colheita. O peso de
 teste ajustado de grão é determinado para ser o peso em
 libras por alqueire, ajustado para nível de umidade de
 grãos na colheita.

20 Como aqui usado, "polinucleotídeo" inclui referência a
 um desoxirribopolinucleotídeo, ribopolinucleotídeo, ou
 análogos desses que possuem a natureza essencial de um
 ribonucleotídeo natural no qual hibridizam, sob condições
 de hibridização estridentes, para substancialmente a mesma
 25 seqüência de nucleotídeos como nucleotídeos naturalmente

ocorrentes e/ou permitem a tradução no mesmo aminoácido(s) como o(s) nucleotídeo(s) naturalmente ocorrente(s). Um polinucleotídeo pode ser de comprimento total ou uma subsequência de um gene estrutural heterólogo ou regulador.

5 A menos que indicado ao contrário, o termo inclui referência à sequência especificada, assim como, à sequência complementar dessa. Assim, DNAs ou RNAs com espinhas dorsais modificadas para estabilidade ou por outras razões são "polinucleotídeos" como aquele termo é pretendido

10 aqui. Além do mais, DNAs ou RNAs compreendendo bases não usuais, tais como inosina, ou bases modificadas, tais como bases tritiladas, para dar apenas dois exemplos, são polinucleotídeos como o termo é aqui usado. Será ponderado que uma grande variedade de modificações foi feita para DNA

15 e RNA que servem a vários propósitos úteis conhecidos daqueles especialistas na técnica. O termo polinucleotídeo, como aqui empregado, abrange tais formas de polinucleotídeos modificadas quimicamente, enzimaticamente ou metabolicamente, assim como as formas químicas de DNA e RNA

20 características de vírus e células, incluindo *inter alia*, células simples e complexas.

Os termos "polipeptídeo," "peptídeo," e "proteína" são aqui usados intercambiavelmente para referir-se a um

25 polímero de resíduos de aminoácidos. Os termos se aplicam

a polímeros de aminoácidos nos quais um ou mais resíduos de aminoácido são análogos químicos artificiais de um aminoácido correspondente naturalmente ocorrente, assim como a polímeros de aminoácidos naturalmente ocorrentes.

5

Como aqui usado "promotor" inclui referência a uma região de DNA acima do início de transcrição e envolvida no reconhecimento e ligação de RNA polimerase e outras proteínas para iniciar a transcrição. Um "promotor

10 vegetal" é um promotor capaz de iniciar a transcrição em células vegetais. Promotores vegetais exemplares incluem, mas não são limitados a, aqueles que são obtidos a partir de plantas, vírus vegetais, e bactérias que compreendem genes expressos em células vegetais, tais como

15 *Agrobacterium* ou *Rhizobium*. Exemplos são promotores que preferencialmente iniciam a transcrição em certos tecidos, tais como folhas, raízes, sementes, fibras, vasos do xilema, traqueídeos, ou esclerênquima. Tais promotores são referidos como "tecido-preferenciais". Um promotor

20 específico de "tipo de célula" primariamente dirige a expressão em certos tipos de células em um ou mais órgãos, por exemplo, células vasculares em raízes ou folhas. Um promotor "induzido" ou "regulável" é um promotor, que está sob controle ambiental. Exemplos de condições ambientais

25 que pode efetuar a transcrição por promotores induzidos

incluem condições anaeróbicas ou a presença de luz. Outro tipo de promotor é um promotor regulado por desenvolvimento, por exemplo, um promotor que dirige a expressão durante o desenvolvimento do pólen. Promotores preferidos de tecido, específicos de tipo de célula, regulados por desenvolvimento e induzidos constituem a classe de promotores "não constitutivos". Um promotor "constitutivo" é um promotor, que está ativo sob a maioria das condições ambientais.

10

O termo "polipeptídeo ARGOS" refere-se a uma ou mais seqüências de aminoácidos. O termo também inclui fragmentos, variantes, homólogos, alelos ou precursores (e.g., pré-proteínas ou pró-proteínas) dessas. Uma "proteína ARGOS" compreende um polipeptídeo ARGOS. A menos que declarado de outra forma, o termo "ácido nucléico de ARGOS" significa um ácido nucléico compreendendo um polinucleotídeo ("polinucleotídeo de ARGOS") codificando um polipeptídeo ARGOS.

20

Como aqui usado "recombinante" inclui referência a uma célula ou vetor, que foi modificado pela introdução de um ácido nucléico heterólogo ou que a célula é derivada de uma célula modificada dessa maneira. Assim, por exemplo, células recombinantes expressam genes que não são

25

encontrados de forma idêntica na forma nativa (não recombinante) da célula ou expressam genes nativos que são, de outra forma, expressos anormalmente, super-expressos ou não expressos por completo como resultado de intervenção humana deliberada. O termo "recombinante" como aqui usado não engloba a alteração da célula ou vetor por eventos naturalmente ocorrentes (e.g., mutação espontânea, transformação/transdução/transposição natural) tais como aqueles ocorrendo sem intervenção humana deliberada.

10

Como aqui usado, um "cassete de expressão recombinante" é uma construção de ácidos nucleicos gerada recombinantemente ou sinteticamente, com uma série de elementos de ácidos nucleicos especificados, que permitem a transcrição de um ácido nucleico em particular em uma célula alvo. O cassete de expressão recombinante pode ser incorporado em um plasmídeo, cromossomo, DNA mitocondrial, DNA de plastídeo, vírus, ou fragmento de ácido nucleico. Tipicamente, a porção recombinante de cassete de expressão de um vetor de expressão inclui, dentre outras seqüências, um ácido nucleico a ser transcrito, e um promotor.

Os termos "resíduo" ou "resíduo de aminoácido" ou "aminoácido" são usados intercambiavelmente aqui para referir-se a um aminoácido que é incorporado em uma

25

proteína, polipeptídeo, ou peptídeo (coletivamente "proteína"). O aminoácido pode ser um aminoácido naturalmente ocorrente e, a menos que limitado de outra forma, pode englobar análogos conhecidos de aminoácidos naturais que podem funcionar de maneira similar como aminoácidos naturalmente ocorrentes.

O termo "hibridiza seletivamente" inclui referência a hibridização, sob condições de hibridização estringentes, de uma seqüência de ácidos nucléicos a uma seqüência de ácidos nucléicos alvo especificada a um grau detectavelmente maior (e.g., pelo menos 2 vezes sobre a base) do que sua hibridização a seqüências de ácidos nucléicos não alvo e para a exclusão substancial de ácidos nucléicos não alvo. Seqüências hibridizando seletivamente tipicamente possuem cerca de pelo menos 40% de identidade de seqüência, preferencialmente 60-90% de identidade de seqüência, e mais preferencialmente 100% de identidade de seqüência (i.e., complementar) uma à outra.

20

Os termos "condições estringentes" ou "condições de hibridização estringentes" incluem referência a condições sob as quais uma sonda irá hibridizar a sua seqüência alvo em um grau detectavelmente maior do que a outras seqüências (e.g., pelo menos 2 vezes sobre a base). Condições

25

estringentes são dependentes de sequência e serão diferentes em diferentes circunstâncias. Controlando a estringência das condições de hibridização e/ou lavagem, sequências alvo que são 100% complementares à sonda podem ser identificadas (sondagem homóloga). Alternativamente, condições de estringência podem ser ajustadas para permitir alguma falta de correspondência em sequências de forma que graus menores de similaridade sejam detectados (sondagem heteróloga). Otimamente, a sonda é de aproximadamente 500 nucleotídeos em comprimento, mas pode variar muito em comprimento a partir de menos de 500 nucleotídeos até igual ao comprimento total da sequência alvo.

Tipicamente, condições estringentes serão aquelas nas quais a concentração de sais é menor do que cerca de 1,5 M de íons de Na, tipicamente concentração de cerca de 0,01 a 1,0 M de íons de Na (ou outros sais) em pH 7,0 a 8,3 e a temperatura é de pelo menos cerca de 30 C para sondas curtas (e.g., 10 a 50 nucleotídeos) e de pelo menos cerca de 60°C para sondas longas (e.g., maiores que 50 nucleotídeos). Condições estringentes podem ser alcançadas, também, com a adição de agentes desestabilizantes, tais como formamida ou Denhardt's. Condições exemplares de baixa estringência incluem hibridização com uma solução tampão de 30 a 35% de

formamida, NaCl 1 M, SDS 1% (sódio dodecil sulfato) a 37°C, e uma lavagem em SSC 1X a 2X (SSC 20X = NaCl 3,0 M/trissódio citrato 0,3 M) a 50 a 55°C. Condições exemplares de estringência moderada incluem hibridização em 40 a 45% formamida, NaCl 1,0 M, SDS 1% a 37°C, e uma lavagem em 0,5X a SSC 1X a 55 a 60°C. Condições exemplares de estringência elevada incluem hibridização em formamida 50%, NaCl 1 M, SDS 1% a 37 C, e uma lavagem em SSC 0,1X a 60 a 65°C por pelo menos 30 minutos. A especificidade é tipicamente a função de lavagens pós hibridização, os fatores críticos sendo a força iônica e temperatura da solução de lavagem final. Para híbridos DNA-DNA, o ponto térmico de derretimento (T_m) pode ser aproximado a partir da equação de Meinkoth e Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$; onde M é a molaridade de cátions monovalentes, %GC é a porcentagem de nucleotídeos guanossina e citosina no DNA, % form é a porcentagem de formamida na solução de hibridização, e L é o comprimento do híbrido em pares de bases. A T_m é a temperatura (sob definidas força iônica e pH) na qual 50% de uma sequência alvo complementar hibridiza a uma sonda perfeitamente correspondente. A T_m é reduzida em cerca de 1°C para cada 1% de falta de correspondência; assim, condições de T_m , hibridização, e/ou lavagem podem ser ajustadas para hibridizar a seqüências da

identidade desejada. Por exemplo, se seqüências com identidade $\geq 90\%$ são procuradas, a T_m pode ser diminuída em 10°C . Por exemplo, se seqüências com $\geq 90\%$ de identidade são procuradas, a T_m pode ser diminuída em 10°C .

5 Geralmente, condições estridentes são selecionadas para serem cerca de 5°C menores do que o ponto térmico de derretimento (T_m) para a seqüência específica e seu complemento em uma definida força iônica e pH. Contudo, condições severamente estridentes podem utilizar uma

10 hibridização e/ou lavagem a 1, 2, 3, ou 4°C menor do que o ponto térmico de derretimento (T_m); condições moderadamente estridentes podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 6, 7, 8, 9 ou 10°C menor do que o ponto térmico de derretimento (T_m); condições de baixa estringência podem

15 utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 11, 12, 13, 14, 15 ou 20°C menor do que o ponto térmico de derretimento (T_m).

Usando a equação, composições de hibridização e lavagem, e T_m desejada, aqueles de conhecimento ordinário entenderão que variações na estringência de soluções de hibridização

20 e/ou lavagem são inerentemente descritas. Se o grau desejado de falta de correspondência resulta em uma T_m de menos do que 45°C (solução aquosa) ou 32°C (solução de formamida), é preferível aumentar a concentração de SSC de forma que uma maior temperatura possa ser usada. Um guia

25 extensivo para a hibridização de ácidos nucléicos é

encontrado em Tijssen, LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY--HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, part I, chapter 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," Elsevier, New York (1993); and CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, chapter 2, Ausubel, et al., eds, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995). A menos que declarado de outra forma, na presente aplicação estringência elevada é definida como hibridização em SSC 4X, Denhardt's 5X (5 g Ficoll, 5 g polivinipirrolidona, 5 g albumina de soro bovino em 500 ml de água), 0,1 mg/ml de DNA de esperma de salmão fervido, e Na fosfato 25 mM a 65°C, e uma lavagem em SSC 0,1X, SDS 0,1% a 65°C.

15

Como aqui usado, "planta transgênica" inclui referência a uma planta, que compreende em seu genoma um polinucleotídeo heterólogo. Geralmente, o polinucleotídeo heterólogo é estavelmente integrado no genoma de forma que o polinucleotídeo é passado a sucessivas gerações. O polinucleotídeo heterólogo pode ser integrado no genoma sozinho ou como parte de um cassete de expressão recombinante. "Transgênico" é aqui usado para incluir qualquer célula, linha de célula, calo, tecido, parte de planta ou planta, o genótipo da qual tenha sido alterado

pela presença de ácido nucléico heterólogo incluindo aqueles transgênicos inicialmente alterados dessa forma, assim como aqueles criados por cruzamentos sexuais ou propagação assexuada a partir do transgênico inicial. O
5 termo "transgênico", como aqui usado, não engloba a alteração do genoma (cromossômico ou extra-cromossômico) por métodos convencionais de melhoramento vegetal ou por eventos naturalmente ocorrentes, tais como fertilização cruzada aleatória, infecção viral não recombinante,
10 transformação bacteriana não recombinante, transposição não recombinante, ou mutação espontânea.

Como aqui usado, "vetor" inclui referência a um ácido nucléico usado na transfecção de uma célula hospedeira e no
15 qual pode ser inserido um polinucleotídeo. Vetores são freqüentemente *replicons*. Vetores de expressão permitem a transcrição de um ácido nucléico aí inserido.

Os seguintes termos são usados para descrever as
20 relações de seqüência entre dois ou mais ácidos nucléicos ou polinucleotídeos ou polipeptídeos: (a) "seqüência referência", (b) "janela de comparação", (c) "identidade de seqüência", (d) "porcentagem de identidade de seqüência", e (e) "identidade substancial".

Como aqui usado, "seqüência referência" é uma seqüência definida usada como base para comparação de seqüências. Uma seqüência referência pode ser um subgrupo ou a totalidade de uma seqüência especificada; por exemplo, 5 como um segmento de um cDNA ou seqüência gênica de comprimento total, ou o cDNA ou seqüência gênica completos.

Como aqui usado, "janela de comparação" faz referência a um segmento contíguo e específico de uma seqüência de 10 polinucleotídeos, caracterizado pelo fato de que a seqüência de polinucleotídeos na janela de comparação pode ser comparada a uma seqüência referência, caracterizado pelo fato de que a porção da seqüência de polinucleotídeos na janela de comparação pode compreender adições ou 15 deleções (i.e., espaços) comparada à seqüência referência (que não compreende adições ou deleções) para ótimo alinhamento dos dois polinucleotídeos. Geralmente, a janela de comparação é de pelo menos 20 nucleotídeos contíguos em comprimento, e opcionalmente pode ser de 30, 20 40, 50, 100, ou mais longa. Aqueles especialistas na técnica entendem que evitar uma alta similaridade para uma seqüência referência devido à inclusão de espaços (*gaps*) na seqüência de polinucleotídeos, uma penalidade por espaço é tipicamente introduzida e subtraída do número de 25 correspondências.

Métodos de alinhamento de seqüências para comparação são bem conhecidos na técnica. O algoritmo de homologia local (BESTFIT) de Smith and Waterman, (1981) *Adv. Appl. Math* 2:482, pode conduzir o alinhamento ótimo de seqüências para comparação; pelo algoritmo de alinhamento de homologia (GAP) de Needleman and Wunsch, (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-53; pela busca para método de similaridade (Tfasta and Fasta) de Pearson and Lipman, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444; por implementações computadorizadas desses algoritmos, incluindo, mas não se limitando a: CLUSTAL no programa PC/Gene da Intelligenetics, Mountain View, California, GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, e TFASTA no pacote de software Wisconsin Genetics Software Package, Version 8 (disponibilizado pela Genetics Computer Group (GCG® programs (Accelrys, Inc., San Diego, CA))). O programa CLUSTAL é bem descrito por Higgins and Sharp, (1988) *Gene* 73:237-44; Higgins and Sharp, (1989) *CABIOS* 5:151-3; Corpet, et al., (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang, et al., (1992) *Computer Applications in the Biosciences* 8:155-65, e Pearson, et al., (1994) *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31. O programa preferido para usar alinhamento ótimo global de múltiplas seqüências é PileUp (Feng and Doolittle, (1987) *J. Mol. Evol.*, 25:351-60 que é similar ao método descrito por Higgins and Sharp, (1989)

CABIOS 5:151-53 e incorporado por referência daqui em diante). A família BLAST de programas que podem ser usados para buscas de similaridade em base de dados inclui: BLASTN para buscas por seqüências de nucleotídeos em relação a
5 seqüências de nucleotídeos da base de dados; BLASTX para buscas por seqüências de nucleotídeos em relação a base de dados de seqüências de proteínas; BLASTP para buscas por seqüências de proteínas em relação à base de dados de seqüências de proteínas; TBLASTN para busca por seqüências
10 de proteína em relação a base de dados de seqüências de nucleotídeo; e TBLASTX para buscas por seqüências de nucleotídeos em relação à base de dados de seqüências de nucleotídeos. Ver CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Chapter 19, Ausubel, et al., eds., Greene Publishing and
15 Wiley-Interscience, New York (1995).

GAP usa o algoritmo de Needleman e Wunsch, *supra*, para encontrar o alinhamento de duas seqüências completas que maximiza o número de correspondências e minimiza o número
20 de espaços. GAP considera todas as posições de alinhamento e de espaços possíveis e cria o alinhamento com o maior número de bases com correspondência e o menor de espaços. Isto permite a provisão de uma penalidade de criação de espaços e uma penalidade de extensão de espaços em unidades
25 de bases com correspondência. GAP deve fazer um saldo de

número de penalidade de criação de espaços de correspondências para cada espaço que insere. Se uma penalidade por extensão de espaço maior que zero é escolhida, GAP deve, adicionalmente, fazer um saldo para
5 cada espaço inserido do comprimento do espaço vezes a penalidade por extensão de espaço. Valores padrão de penalidade de criação de espaços e valores de penalidade de extensão de espaços na Versão 10 do pacote de software Wisconsin Genetics Software Package são 8 e 2,
10 respectivamente. As penalidades de criação e extensão de espaços podem ser expressas como um número inteiro selecionado do grupo de números inteiros consistindo de 0 a 200. Assim, por exemplo, as penalidades de criação e extensão de espaços podem ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,
15 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ou maiores.

GAP apresenta um membro da família de alinhamentos ótimos. Podem existir vários membros dessa família, mas nenhum outro membro possui uma melhor qualidade. GAP
20 apresenta quatro figuras de mérito para alinhamentos: *Quality*, *Ratio*, *Identity*, e *Similarity*. A *Quality* é a métrica maximizada para alinhar as seqüências. *Ratio* é a *Quality* dividida pelo número de bases no segmento mais curto. *Percent Identity* é o percentual dos símbolos que de
25 fato se correspondem. *Percent Similarity* é o percentual

dos símbolos que são similares. Símbolos que estão através dos espaços são ignorados. Uma similaridade é pontuada quando o valor da matriz de pontuação para um par de símbolos é maior ou igual a 0,50, o limite de similaridade.

5 A matriz de pontuação usada na Versão 10 do pacote de software GCG Wisconsin Genetics Software Package é BLOSUM62 (ver, Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915).

10 A menos que declarado de outra forma, valores de identidade/similaridade de sequência aqui providos referem-se ao valor obtido usando a suíte de programas BLAST 2.0 usando parâmetros padrão (Altschul, et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402).

15

Como aqueles de conhecimento ordinário na técnica entenderão, buscas BLAST assumem que proteínas podem ser modeladas como seqüências aleatórias. Contudo, várias proteínas reais compreendem regiões de seqüências não
20 aleatórias, que podem ser traços homopoliméricos, repetições de período curtas, ou regiões enriquecidas em um ou mais aminoácidos. Tais regiões de baixa complexidade podem ser alinhadas entre proteínas não relacionadas, apesar de outras regiões da proteína serem totalmente
25 dissimilares. Um número de programas de filtro de baixa

complexidade pode ser empregado para reduzir tais alinhamentos de baixa complexidade. Por exemplo, filtros de baixa complexidade SEG (Wooten and Federhen, (1993) *Comput. Chem.* 17:149-63) e XNU (Claverie and States, (1993) *Comput. Chem.* 17:191-201) podem ser empregados sozinhos ou em combinação.

Como aqui usado, "identidade de seqüência", ou "identidade" no contexto de duas seqüências de ácidos nucléicos ou polipeptídicas de polinucleotídeos ou polipeptídeos, faz referência aos resíduos nas duas seqüências que são a mesma quando alinhadas para correspondência máxima sobre uma janela de comparação específica. Quando a porcentagem de identidade de seqüência é usada em referência a proteínas, é reconhecido que posições de resíduos, que não são idênticos, freqüentemente diferem por substituições de aminoácidos conservativas, onde os resíduos de aminoácidos são substituídos por outros resíduos de aminoácidos com propriedades químicas similares (e.g., carga ou hidrofobicidade) e, portanto, não mudam as propriedades funcionais da molécula. Quando seqüências diferem em substituições conservadas, a identidade de seqüência percentual pode ser ajustada para cima para corrigir a natureza conservativa da substituição. Seqüências que diferem por tais substituições conservadas

são ditas por ter "similaridade de sequência" ou "similaridade". Meios de fazer esse ajuste são bem conhecidos daqueles especialistas na técnica. Tipicamente, isso envolve pontuar uma substituição conservada como uma
5 parcial, ao invés de uma falta de correspondência completa, aumentando, dessa forma, a porcentagem de identidade de sequência. Assim, por exemplo, onde um aminoácido idêntico recebe uma pontuação de 1 e uma substituição não conservativa recebe uma pontuação de zero, uma substituição
10 conservada recebe uma pontuação entre zero e 1. A pontuação de substituições conservadas é calculada, e.g., de acordo com o algoritmo de Meyers and Miller, (1988) *Computer Applic. Biol. Sci.* 4:11-17, e.g., como implementado no programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain
15 View, California, USA).

Como aqui usado, "porcentagem de identidade de sequência" significa o valor determinado comparando-se duas sequências otimamente alinhadas por uma janela de
20 comparação, caracterizado pelo fato de que a porção da sequência de polinucleotídeos na janela de comparação pode compreender adições ou deleções (i.e., espaços), se comparada à sequência referência (que não compreende adições ou deleções) para alinhamento ótimo das duas
25 sequências. A porcentagem é calculada determinando-se o

número de posições nas quais a base de ácido nucléico idêntica ou resíduo de aminoácido ocorre em ambas seqüências para permitir o número de posições com correspondência, dividindo o número de posições com correspondência pelo número total de posições na janela de comparação, e multiplicando o resultado por 100 para produzir a porcentagem de identidade de seqüência.

O termo "identidade substancial" de seqüências de polinucleotídeos significa que um polinucleotídeo compreende uma seqüência que tem entre 50-100% de identidade de seqüência, preferencialmente pelo menos 50% de identidade de seqüência, preferencialmente pelo menos 60% de identidade de seqüência, preferencialmente pelo menos 70%, mais preferencialmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 90%, e mais preferencialmente pelo menos 95%, comparada a uma seqüência referência usando um dos programas de alinhamento descritos usando parâmetros padrão. Um especialista na técnica reconhecerá que esses valores podem ser ajustados apropriadamente para determinar a identidade correspondente de proteínas codificadas por duas seqüências de nucleotídeos, levando-se em conta a degeneração de códon, similaridade de aminoácidos, posicionamento de fase de leitura, e similares. Identidade substancial de seqüências de aminoácidos para esses

propósitos significa, normalmente, identidade de sequência entre 55-100%, preferencialmente pelo menos 55%, preferencialmente pelo menos 60%, mais preferencialmente pelo menos 70%, 80%, 90% e mais preferencialmente pelo menos 95%.

Outra indicação de que seqüências de nucleotídeos são substancialmente idênticas é se duas moléculas hibridizam uma à outra sob condições estringentes. A degeneração do código genético permite várias substituições de aminoácidos que levam a variedades na seqüência de nucleotídeos que codifica para o mesmo aminoácido, é possível, assim, é possível que a seqüência de DNA poderia codificar o mesmo polipeptídeo mas não hibridiza uma à outra sob condições estringentes. Isso pode ocorrer, e.g., quando uma cópia de um ácido nucléico é criada usando a degeneração de códon máxima permitida pelo código genético. Uma indicação de que as seqüências de ácidos nucléicos são substancialmente idênticas é que o polipeptídeo, que o primeiro ácido nucléico codifica, é imunologicamente reativo ao polipeptídeo codificado pelo segundo ácido nucléico.

O termo "identidade substancial", no contexto de um peptídeo, indica que um peptídeo compreende uma seqüência com identidade de seqüência entre 55-100% em relação a uma

seqüência referência preferencialmente pelo menos 55% de
identidade de seqüência, preferencialmente 60%
preferencialmente 70%, mais preferencialmente 80%, mais
preferencialmente pelo menos 90% ou 95% de identidade de
5 seqüência em relação à seqüência referência sobre uma
janela de comparação especificada. Preferencialmente,
alinhamento ótimo é conduzido usando o algoritmo de
alinhamento de homologia de Needleman e Wunsch, *supra*. Uma
indicação de que duas seqüências peptídicas são
10 substancialmente idênticas é que um peptídeo é
imunologicamente reativo com anticorpos criados contra o
segundo peptídeo. Assim, um peptídeo é substancialmente
idêntico a um segundo peptídeo, por exemplo, onde dois
peptídeos diferem apenas por uma substituição conservada.
15 Além disso, um peptídeo pode ser substancialmente idêntico
a um segundo peptídeo quando eles diferem por uma mudança
não conservativa se o epítipo que o anticorpo reconhece é
substancialmente idêntico. Peptídeos que são
"substancialmente similares" compartilham seqüências como
20 notado acima exceto aquelas posições de resíduos, que não
são idênticas, podem diferir por mudanças de aminoácido
conservativas.

A invenção descreve polinucleotídeos e polipeptídeos
25 ARGOS. Os novos nucleotídeos e proteínas da invenção

possuem um padrão de expressão que indica que eles regulam o número de células e, assim, desempenham um papel importante no desenvolvimento vegetal. Os polinucleotídeos são expressos em vários tecidos vegetais. Os
5 polinucleotídeos e polipeptídeos provêm, assim, uma oportunidade de manipular o desenvolvimento vegetal para alterar o desenvolvimento de sementes e tecido vegetativo, sincronismo ou composição. Isso pode ser usado para criar uma planta estéril, uma planta sem sementes ou uma planta
10 com composição de endosperma alterada.

Ácidos nucleicos

A presente invenção provê, *inter alia*, ácidos
15 nucleicos isolados de RNA, DNA, e análogos e/ou quimeras desses, compreendendo um polinucleotídeo de ARGOS.

A presente invenção também inclui polinucleotídeos otimizados para expressão em diferentes organismos. Por
20 exemplo, para expressão do polinucleotídeo em uma planta de milho, a sequência pode ser alterada para contabilizar para preferências específicas de códon e para alterar o conteúdo de GC, como de acordo com Murray, *et al*, *supra*. O uso de códon em milho para 28 genes de plantas de milho é listado
25 na Tabela 4 de Murray, *et al.*, *supra*.

Os ácidos nucléicos de ARGOS da presente invenção compreendem polinucleotídeos de ARGOS isolados que incluem:

5 (a) um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo ARGOS e variantes conservadamente modificados e polimórficos desses;

(b) um polinucleotídeo tendo pelo menos 70% de identidade de sequência em relação a polinucleotídeos de (a) ou (b);

10 (c) sequências complementares de polinucleotídeos de (a) ou (b).

A seguinte tabela, Tabela 1, lista as identidades específicas dos polinucleotídeos e polipeptídeos aqui descritos.

TABELA 1.

Nome do Gene	Espécie vegetal	Polinucleotídeo/Polipeptídeo	SEQ ID NO:
ZmARGOS1	<i>Zea mays</i>	Polinucleotídeo Polipeptídeo Sequência genômica	SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 2 SEQ ID NO: 71
ZmARGOS2	<i>Zea mays</i>	Polinucleotídeo Polipeptídeo	SEQ ID NO: 3 SEQ ID NO: 4
ZmARGOS3	<i>Zea mays</i>	Polinucleotídeo Polipeptídeo	SEQ ID NO: 5 SEQ ID NO: 6
ZmARGOS4	<i>Zea mays</i>	Polinucleotídeo Polipeptídeo	SEQ ID NO: 7 SEQ ID NO: 40
ZmARGOS5	<i>Zea mays</i>	Polinucleotídeo Polipeptídeo	SEQ ID NO: 8 SEQ ID NO: 41
ZmARGOS6	<i>Zea mays</i>	Polinucleotídeo Polipeptídeo	SEQ ID NO: 9 SEQ ID NO: 42
ZmARGOS7	<i>Zea mays</i>	Polinucleotídeo Polipeptídeo	SEQ ID NO: 10 SEQ ID NO: 43
ZmARGOS8	<i>Zea mays</i>	Polinucleotídeo Polipeptídeo	SEQ ID NO: 11 SEQ ID NO: 44

ZmARGOS9	<i>Zea mays</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 12 SEQ ID NO: 45
OsARGOS1	<i>Oryza sativa</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 46
OsARGOS2	<i>Oryza sativa</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 14 SEQ ID NO: 47
OsARGOS3	<i>Oryza sativa</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 15 SEQ ID NO: 48
OsARGOS4	<i>Oryza sativa</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 16 SEQ ID NO: 49
OsARGOS5	<i>Oryza sativa</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 17 SEQ ID NO: 50
OsARGOS6	<i>Oryza sativa</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 18 SEQ ID NO: 51
OsARGOS7	<i>Oryza sativa</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 19 SEQ ID NO: 52
OsARGOS8	<i>Oryza sativa</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 20 SEQ ID NO: 53
GmARGOS1	<i>Glycine max</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 21 SEQ ID NO: 54
GmARGOS2	<i>Glycine max</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 22 SEQ ID NO: 55
GmARGOS3	<i>Glycine max</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 23 SEQ ID NO: 56
GmARGOS4	<i>Glycine max</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 24 SEQ ID NO: 57
GmARGOS5	<i>Glycine max</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 25 SEQ ID NO: 58
SbARGOS1	<i>Sorghum bicolor</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 29 SEQ ID NO: 62
SbARGOS2	<i>Sorghum bicolor</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 30 SEQ ID NO: 63
SbARGOS3	<i>Sorghum bicolor</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 31 SEQ ID NO: 64
SbARGOS4	<i>Sorghum bicolor</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 32 SEQ ID NO: 65
SbARGOS5	<i>Sorghum bicolor</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 33 SEQ ID NO: 66
SbARGOS6	<i>Sorghum bicolor</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 34 SEQ ID NO: 67
SbARGOS7	<i>Sorghum bicolor</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 35 SEQ ID NO: 68
SbARGOS8	<i>Sorghum bicolor</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 36 SEQ ID NO: 69
SbARGOS9	<i>Sorghum bicolor</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 37 SEQ ID NO: 70
AtARGOS1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 26 SEQ ID NO: 59
AtARGOS2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 27 SEQ ID NO: 60
AtARGOS3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Polinucleotídeo Poliipeptídeo	SEQ ID NO: 28 SEQ ID NO: 61

Construção de Ácidos nucléicos

Os ácidos nucléicos isolados da presente invenção podem ser feitos usando (a) métodos recombinantes padrão, (b) técnicas sintéticas, ou combinações desses. Em alguns avanços, os polinucleotídeos da presente invenção serão
5 clonados, amplificados, ou, ao contrário, construídos a partir de um fungo ou bactéria.

Os ácidos nucléicos podem convenientemente compreender seqüências além de um polinucleotídeo da presente invenção.
10 Por exemplo, um sítio de multiclonagem compreendendo um ou mais sítios de restrição de endonuclease pode ser inserido no ácido nucléico para auxiliar no isolamento do polinucleotídeo. Ainda, seqüências traduzíveis podem ser inseridas para auxiliar no isolamento do polinucleotídeo
15 traduzível da presente invenção. Por exemplo, uma seqüência marcadora de hexa-histidina provê um meio conveniente para purificar as proteínas da presente invenção. O ácido nucléico da presente invenção - excluindo a seqüência de polinucleotídeos - é opcionalmente
20 um vetor, adaptador, ou ligante para clonagem e/ou expressão de um polinucleotídeo da presente invenção. Seqüências adicionais podem ser adicionadas para tais seqüências de clonagem e/ou expressão para otimizar sua função na clonagem e/ou expressão, para auxiliar no
25 isolamento do polinucleotídeo, ou para melhorar a

introdução do polinucleotídeo em uma célula. Tipicamente, o comprimento de um ácido nucléico da presente invenção menos o comprimento de seu polinucleotídeo da presente invenção é de menos de 20 pares de quilobases, 5 freqüentemente de menos de 15 kb, e freqüentemente de menos de 10 kb. O uso de vetores de clonagem, vetores de expressão, adaptadores, e ligantes é bem conhecido na técnica. Ácidos nucléicos exemplares incluem tais vetores como: M13, lambda ZAP Express, lambda ZAP II, lambda gt10, 10 lambda gt11, pBK-CMV, pBK-RSV, pBluescript II, lambda DASH II, lambda EMBL 3, lambda EMBL 4, pWE15, SuperCos 1, SurfZap, Uni-ZAP, pBC, pBS+/-, pSG5, pBK, pCR-Script, pET, pSPUTK, p3'SS, pGEM, pSK+/-, pGEX, pSPORTI and II, pOPRSVI CAT, pOPI3 CAT, pXT1, pSG5, pPbac, pMbac, pMC1neo, pOG44, 15 pOG45, pFRT β GAL, pNEO β GAL, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pRS413, pRS414, pRS415, pRS416, lambda MOSSlox, e lambda MOSElox. Vetores opcionais para a presente invenção incluem, mas não estão limitados a, lambda ZAP II, e pGEX. Para uma descrição de vários ácidos nucléicos ver, e.g., 20 Stratagene Cloning Systems, Catalogs 1995, 1996, 1997 (La Jolla, CA); and, Amersham Life Sciences, Inc, Catalog '97 (Arlington Heights, IL).

Métodos sintéticos para construir ácidos nucléicos

Os ácidos nucleicos isolados da presente invenção podem ser também preparados por síntese química direta por métodos, tais como, o método de fosfotriéster de Narang, et al., (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90-9; o método de fosfodiéster de Brown, et al., (1979) *Meth. Enzymol.* 68:109-51; o método de dietilfosforamidita de Beaucage et al., (1981) *Tetra. Letts.* 22(20):1859-62; o método de fosforamidita triéster em fase sólida descrito por Beaucage, et al., *supra*, e.g., usando um sintetizador automatizado, e.g., como descrito em Needham-VanDevanter, et al., (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:6159-68; e, o método de suporte sólido de Patente US No. 4.458.066. A síntese química geralmente produz um oligonucleotídeo de fita simples. Este pode ser convertido DNA de dupla-fita por hibridização com uma sequência complementar ou por polimerização com uma DNA polimerase usando a fita simples como modelo. Um especialista reconhecerá que enquanto a síntese química de DNA é limitada a seqüências de cerca de 100 bases, seqüências mais longas podem ser obtidas pela ligação de seqüências mais curtas.

UTRs e Preferência de Códon

Em geral, a eficiência de tradução foi vista por ser regulada por elementos de seqüência específicos na região

5' não codificadora ou não traduzida (UTR 5') do RNA. Motivos de sequência positivos incluem sequências consenso de iniciação de tradução (Kozak, (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:8125) e a estrutura 5' cap 7 metil GpppG RNA cap (Drummond, et al., (1985) *Nucleic Acids Res.* 13:7375). Elementos negativos incluem estruturas *stem-loop* estáveis intramoleculares UTR 5' (Muesing, et al., (1987) *Cell* 48:691) e sequências AUG ou quadros de iniciação de leitura curtos precedidos por um AUG apropriado no UTR 5' (Kozak, supra, Rao, et al., (1988) *Mol. and Cell. Biol.* 8:284). Dessa maneira, a presente invenção provê regiões UTR 5' e/ou 3' para modulação da tradução de sequências codificadoras heterólogas.

15 Ainda, os segmentos codificando polipeptídeos dos polinucleotídeos da presente invenção podem ser modificados para alterar o uso de códons. O uso de códons alterado pode ser empregado para alterar a eficiência de tradução e/ou para otimizar a sequência codificadora para expressão em um hospedeiro desejado ou para otimizar o uso de códon em uma sequência heteróloga para expressão em milho. O uso de códon nas regiões codificadoras dos polinucleotídeos da presente invenção pode ser analisado estatisticamente usando pacotes de *software* disponíveis comercialmente, tais como "Codon Preference" disponibilizado pelo University of

Wisconsin Genetics Computer Group. Ver, Devereaux, et al.,
(1984) *Nucleic Acids Res.* 12:387-395; or MacVector 4.1
(Eastman Kodak Co., New Haven, Conn.). Assim, a presente
invenção provê uma característica de frequência de uso de
5 códons da região codificadora de pelo menos um dos
polinucleotídeos da presente invenção. O número de
polinucleotídeos (3 nucleotídeos por aminoácido) que podem
ser usados para determinar uma frequência de uso de códons
pode ser qualquer número inteiro de 3 até o número de
10 polinucleotídeos da presente invenção como aqui provido.
Opcionalmente, os polinucleotídeos serão as seqüências de
comprimento total. Um número exemplar de seqüências para
análise estatística pode ser pelo menos 1, 5, 10, 20, 50 ou
100.

15

Embaralhamento de Seqüências

A presente invenção provê métodos para embaralhamento
de seqüências usando polinucleotídeos da presente invenção,
20 e composições resultantes desses. O embaralhamento de
seqüências é descrito na publicação PCT No. WO96/19256.
Ver também, Zhang, et al., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA 94:4504-9; e Zhao, et al., (1998) *Nature Biotech*
16:258-61. Geralmente, o embaralhamento de seqüências
25 provê meios para gerar bibliotecas de polinucleotídeos

tendo uma característica desejada, que pode ser selecionada ou rastreada. Bibliotecas de polinucleotídeos recombinantes são geradas a partir de uma população de polinucleotídeos de sequência relacionados, que compreendem

5 regiões de sequência, as quais possuem identidade de sequência substancial e podem ser homologamente recombinadas *in vitro* ou *in vivo*. A população de polinucleotídeos de sequência recombinada compreende uma subpopulação de polinucleotídeos que possui características

10 desejadas ou vantajosas e que podem ser selecionadas por um método de seleção ou rastreamento adequado. As características podem ser qualquer propriedade ou atributo capaz de ser selecionado ou detectado em um sistema de rastreamento, e pode incluir propriedades de: uma proteína

15 codificada, um elemento transcricional, uma sequência controlando transcrição, processamento de RNA, estabilidade de RNA, conformação de cromatina, tradução, ou outra propriedade de expressão de um gene ou transgene, um elemento de replicação, um elemento se ligando a proteína,

20 ou similares, tais como qualquer aspecto que confira uma propriedade passível de seleção ou detecção. Em alguns avanços, a característica selecionada será uma K_m e/ou K_{cat} alterada sobre a proteína de tipo selvagem como aqui provido. Em outros avanços, uma proteína ou polinucleotídeo

25 gerado a partir de embaralhamento de sequências terá uma

afinidade de ligação de ligante maior do que o polinucleotídeo de tipo selvagem não embaralhado. Ainda em outros avanços, uma proteína ou polinucleotídeo gerado a partir de embaralhamento de seqüências terá um pH ótimo
5 alterado se comparado ao polinucleotídeo de tipo selvagem não embaralhado. O aumento em tais propriedades pode ser de pelo menos 110%, 120%, 130%, 140% ou mais do que 150% do valor de tipo selvagem.

10 **Cassetes de expressão recombinantes**

A presente invenção provê ainda cassetes de expressão recombinantes compreendendo um ácido nucléico da presente invenção. A seqüência de ácidos nucléicos codificando o
15 polinucleotídeo desejado da presente invenção, por exemplo, um cDNA ou uma seqüência genômica, codificando um polipeptídeo longo o suficiente para codificar uma proteína ativa da presente invenção, pode ser usado para construir um cassete de expressão recombinante que pode ser
20 introduzido na célula hospedeira desejada. Um cassete de expressão recombinante compreenderá, tipicamente, um polinucleotídeo da presente invenção operacionalmente ligado a seqüências reguladoras iniciação de transcrição que irão direcionar a transcrição do polinucleotídeo na
25 célula hospedeira visada, tal como tecidos de uma planta

transformada.

Por exemplo, vetores de expressão em plantas podem incluir (1) um gene vegetal clonado sob controle 5 transcricional de seqüências reguladoras 5' e 3' e (2) um marcador de seleção dominante. Tais vetores de expressão em plantas podem conter também, se desejado, uma região reguladora promotora (e.g., uma conferindo expressão induzida ou constitutiva, regulada ambientalmente ou por 10 desenvolvimento, ou específica/seletiva de célula ou tecido), um sítio de início de transcrição, um sítio de ligação de ribossomo, um sinal de processamento de RNA, um sítio de terminação de transcrição, e/ou um sinal de poliadenilação.

15

Um fragmento promotor vegetal que irá direcionar a expressão de um polinucleotídeo da presente invenção em todos os tecidos de uma planta regenerada pode ser empregado. Tais promotores são aqui referidos como 20 promotores "constitutivos" e são ativos sob a maioria das condições ambientais e estados de desenvolvimento ou diferenciação celular. Exemplos de promotores constitutivos incluem o promotor 1'- ou 2'- derivado de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*, o promotor Smas, o 25 promotor de cinamil álcool desidrogenase (Patente US No.

5.683.439), o promotor Nos, o promotor de rubisco, o promotor de GRP1-8, o promotor de 35S de vírus de mosaico de couve-flor (CaMV), como descrito em Odell, et al., (1985) *Nature* 313:810-2; actina de arroz (McElroy, et al., (1990) *Plant Cell* 163-171); ubiquitina (Christensen, et al., (1992) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 e Christensen, et al., (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-89); pEMU (Last, et al., (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-8); MAS (Velten, et al., (1984) *EMBO J.* 3:2723-30); e histona H3 de milho (Lepetit, et al., (1992) *Mol. Gen. Genet.* 231:276-85; e Atanassova, et al., (1992) *Plant Journal* 2(3):291-300); promotor ALS, como descrito em PCT Application No. WO 96/30530; GOS2 (Patente US No. 6.504.083) e outras regiões de iniciação de transcrição de vários genes vegetais conhecidos daqueles especialistas. Para a presente invenção, ubiquitina é o promotor preferido para expressão em plantas monocotiledôneas.

Alternativamente, o promotor vegetal pode dirigir a expressão de um polinucleotídeo da presente invenção em um tecido específico ou pode estar, ao contrário, sob controle ambiental ou de desenvolvimento mais preciso. Tais promotores são referidos aqui como promotores "induzidos" (Rab17, RAD29). Condições ambientais que podem efetuar a transcrição por promotores induzidos incluem ataque de

patógenos, condições anaeróbicas, ou a presença de luz. Exemplos de promotores induzidos são o promotor de Adh1, que é induzido por hipoxia ou estresse de frio, o promotor de Hsp70, que é induzido por estresse de calor, e o
5 promotor de PPKK, que é induzido por luz.

Exemplos de promotores sob controle de desenvolvimento incluem promotores que iniciam a transcrição apenas, ou preferencialmente, em certos tecidos, tais como folhas,
10 raízes, frutos, sementes, ou flores. A operação de um promotor pode variar, também, dependendo de sua localização no genoma. Assim, um promotor induzido pode se tornar completamente ou parcialmente constitutivo em certas localidades.

15

Se a expressão de polipeptídeo é desejada, é geralmente desejável incluir uma região de poliadenilação na extremidade 3' de uma região codificadora de polinucleotídeo. A região de poliadenilação pode ser
20 derivada de uma variedade de genes vegetais, ou de T-DNA. A sequência de extremidade 3' a ser adicionada pode ser derivada de, por exemplo, os genes de nopalina sintase ou octopina sintase, ou alternativamente de outro gene vegetal, ou menos preferencialmente de qualquer outro gene
25 eucarionte. Exemplos de tais elementos reguladores

incluem, mas não estão limitados a, regiões 3' de terminação e/ou poliadenilação, tais como aquelas do gene de nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens* (nos) (Bevan, et al., (1983) *Nucleic Acids Res.* 12:369-85); o
5 gene inibidor de proteinase II de batata (PINII) (Keil, et al., (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:5641-50; and An, et al., (1989) *Plant Cell* 1:115-22); e o gene de CaMV 19S (Mogen, et al., (1990) *Plant Cell* 2:1261-72).

10 Uma sequência de íntron pode ser adicionada à região 5' não traduzida ou a sequência codificadora da sequência codificadora parcial para aumentar a quantidade da mensagem madura que se acumula no citosol. A inclusão de um íntron passível de sofrer *splicing* na unidade de transcrição em
15 ambas as construções de expressão em vegetal e animal foi mostrada por aumentar a expressão gênica em ambos os níveis de mRNA e de proteína até 1000 vezes (Buchman and Berg, (1988) *Mol. Cell Biol.* 8:4395-4405; Callis, et al., (1987) *Genes Dev.* 1:1183-200). Tal intensificação por íntron de
20 expressão gênica é tipicamente máxima quando colocada próxima da extremidade 5' da unidade de transcrição. O uso de íntrons *Adhl-S* de milho íntron 1, 2, e 6, o íntron *Bronze-1* é conhecido na técnica. Ver geralmente, THE MAIZE HANDBOOK, Chapter 116, Freeling and Walbot, eds., Springer,
25 New York (1994).

Sequências sinal de vegetais, incluindo, mas não se limitando a, peptídeo sinal codificando sequências de DNA/RNA que direcionam proteínas para a matriz extracelular da célula vegetal (Dratewka-Kos, et al., (1989) *J. Biol. Chem.* 264:4896-900), tal como o gene de extensão de *Nicotiana plumbaginifolia* (DeLoose, et al., (1991) *Gene* 99:95-100); peptídeos sinal que direcionam proteínas para o vacúolo, tais como o gene de esporamina de batata-doce (Matsuka, et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:834) e o gene de lectina de cevada (Wilkins, et al., (1990) *Plant Cell*, 2:301-13); peptídeos sinal que fazem com que proteínas seja secretadas, tais como aquele de PR1b (Lind, et al., (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:47-53) ou alfa-amilase de cevada (BAA) (Rahmatullah, et al., (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:119, e, aqui incorporados por referência), ou peptídeos sinal que direcionam proteínas para os plastídios, tais como aquele de enoil-Acp redutase de brássicas (Verwaert, et al., (1994) *Plant Mol. Biol.* 26:189-202) são úteis na invenção. A sequência sinal de alfa-amilase de cevada fusionada ao polinucleotídeo ARGOS é a construção preferida para expressão em milho para a presente invenção.

O vetor compreendendo as seqüências de um polinucleotídeo da presente invenção compreenderá, tipicamente, um gene marcador, que confere um fenótipo selecionável em células vegetais. Usualmente, o gene

5 marcador de seleção codificará resistência a antibióticos, com genes adequados incluindo genes codificando resistência ao antibiótico espectinomomicina (e.g., o gene *aada*), o gene de estreptomicina fosfotransferase (SPT) codificando resistência a estreptomicina, o gene de neomicina

10 fosfotransferase (NPTII) codificando resistência a canamicina ou geneticina, o gene de higromicina fosfotransferase (HPT) codificando resistência a higromicina, genes codificando resistência a herbicidas que atuam para inibir a ação de acetolactato sintase (ALS), em

15 particular os herbicidas do tipo sulfoniluréia (e.g., o gene de acetolactato sintase (ALS) contendo mutações levando a tal resistência em particular as mutações S4 e/ou Hra), genes codificando resistência a herbicidas que atuam para inibir a ação de glutamina sintase, tais como

20 fosfinotricina ou basta (e.g., o gene *bar*), ou outros genes conhecidos na técnica. O gene *bar* codifica resistência ao herbicida basta, e o gene ALS gene codifica resistência ao herbicida clorsulfuron.

Vetores típicos úteis para expressão de genes em plantas superiores são bem conhecidos na técnica e incluem vetores derivados do plasmídeo indutor de tumor (Ti) de *Agrobacterium tumefaciens* descrito por Rogers, et al.,
5 (1987) *Meth. Enzymol.* 153:253-77. Aqueles vetores são vetores vegetais integradores já que, em transformação, os vetores integram uma porção de DNA vetor no genoma da planta hospedeira. Vetores exemplares de *A. tumefaciens* úteis aqui são os plasmídeos pKYLX6 e pKYLX7 de Schardl, et
10 al., (1987) *Gene* 61:1-11, e Berger, et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:8402-6. Outro vetor útil aqui é o plasmídeo pBI101.2 que está disponível pela CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA).

15 **Expressão de Proteínas em Células hospedeiras**

Usando os ácidos nucleicos da presente invenção, pode-se expressar uma proteína da presente invenção em uma célula construída de forma recombinante, tal como
20 bactérias, leveduras, células de insetos, de mamíferos, ou preferencialmente células vegetais. As células produzem a proteína em uma condição não natural (e.g., em quantidade, composição, localização, e/ou tempo), pois elas foram geneticamente alteradas através de intervenção humana para
25 fazerem isto.

É esperado que aqueles especialistas na técnica sejam conhecedores de numerosos sistemas de expressão disponíveis para expressão de um ácido nucléico codificando uma proteína da presente invenção. Nenhuma tentativa de descrever em detalhes os vários métodos conhecidos para a expressão de proteínas em procariontes ou eucariontes será feita.

Resumidamente, a expressão de ácidos nucléicos isolados codificando uma proteína da presente invenção será tipicamente alcançada ligando-se operacionalmente, por exemplo, o DNA ou cDNA a um promotor (que é tanto constitutivo ou induzido), seguido por incorporação em um vetor de expressão. Os vetores podem ser adequados para replicação e integração tanto em procariontes ou eucariontes. Vetores de expressão típicos contêm seqüências terminadoras, de iniciação de transcrição e tradução, e promotores úteis para a regulação da expressão do DNA codificando uma proteína da presente invenção. Para obter um nível elevado de expressão de um gene clonado, é desejável construir vetores de expressão que contêm, no mínimo, um promotor forte, tal como ubiquitina, para direcionar a transcrição, um sítio de ligação de ribossomo para iniciação de tradução, e um terminador de transcrição/

tradução. Promotores constitutivos são classificados como provendo uma amplitude de expressão constitutiva. Assim, alguns são promotores constitutivos fracos, e outros são promotores constitutivos fortes. Geralmente, por "promotor fraco" pretende-se um promotor que dirige a expressão de uma sequência codificadora em nível baixo. Por "nível baixo" pretende-se em níveis de cerca de 1/10.000 transcritos até cerca de 1/100.000 transcritos até cerca de 1/500.000 transcritos. Conseqüentemente, um "promotor forte" dirige a expressão de uma sequência codificadora em um "nível elevado", ou cerca de 1/10 transcritos até cerca de 1/100 transcritos até cerca de 1/1.000 transcritos.

Um especialista reconheceria que modificações poderiam ser feitas a uma proteína da presente invenção sem diminuir sua atividade biológica. Algumas modificações podem ser feitas para facilitar a clonagem, expressão, ou incorporação da molécula alvo em uma proteína de fusão. Tais modificações são bem conhecidas daqueles especialistas na técnica e incluem, por exemplo, uma metionina adicionada no amino-terminal para prover um sítio de iniciação, ou aminoácidos adicionais (e.g., poli His) colocados em qualquer dos terminais para criar sítios de restrição, ou códons de terminação, ou seqüências de purificação, convenientemente localizados.

Expressão em procariontes

Células procariontes podem ser usadas como hospedeiros para expressão. Procariontes mais freqüentemente são representados por várias linhagens de *E. coli*; contudo, outras linhagens microbianas podem ser também usadas. Sequências controle procariontes comumente usadas que são aqui definidas para incluir promotores para iniciação de transcrição, opcionalmente com um operador, junto com seqüências de sítio de ligação de ribossomos, incluem tais promotores comumente usados, como os sistemas promotores de beta lactamase (penicilinase) e lactose (lac) (Chang, et al., (1977) *Nature* 198:1056), o sistema promotor de triptofano (trp) (Goeddel, et al., (1980) *Nucleic Acids Res.* 8:4057) e o promotor P L lambda derivado e sítio de ligação de ribossomo de gene N (Shimatake, et al., (1981) *Nature* 292:128). A inclusão de marcadores de seleção em vetores de DNA transfectados em *E. coli* é também útil. Exemplos de tais marcadores incluem genes especificando resistência a ampicilina, tetraciclina, ou cloranfenicol.

O vetor é selecionado para permitir a introdução do gene de interesse na célula hospedeira apropriada. Vetores bacterianos são tipicamente de origem de plasmídeo ou fago.

Células bacterianas apropriadas são infectadas com partículas de vetor de fago ou transfectadas com DNA de vetor de fago sem histonas. Se um vetor de plasmídeo é usado, as células bacterianas são transfectadas com o DNA
5 de vetor de plasmídeo. Sistemas de expressão para expressar uma proteína da presente invenção estão disponíveis usando *Bacillus sp.* e *Salmonella* (Palva, et al., (1983) *Gene* 22:229-35; Mosbach, et al., (1983) *Nature* 302:543-5). O vetor de plasmídeo pGEX-4T-1 da Pharmacia é
10 o vetor de expressão de *E. coli* preferido para a presente invenção.

Expressão em eucariontes

15 Uma variedade de sistemas de expressão eucariontes, tais como leveduras, linhagens de células de insetos, células vegetais e de mamíferos, são conhecidos daqueles especialistas na técnica. Como resumidamente explicado abaixo, a presente invenção pode ser expressa nesses
20 sistemas eucariontes. Em alguns avanços, células vegetais transformadas/transfectadas, como discutido *infra*, são empregadas como sistemas de expressão para a produção das proteínas da atual invenção.

A síntese de proteínas heterólogas em leveduras é bem conhecida. Sherman, et al., (1982) METHODS IN YEAST GENETICS, Cold Spring Harbor Laboratory é um trabalho bem reconhecido descrevendo os vários métodos disponíveis para
5 produzir a proteína em leveduras. Duas leveduras amplamente utilizadas para a produção de proteínas eucariontes são *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*. Vetores, linhagens, e protocolos para expressão em *Saccharomyces* e *Pichia* são conhecidos na técnica e
10 disponibilizados por fornecedores comerciais (e.g., Invitrogen). Vetores adequados usualmente possuem seqüências de controle de expressão, tais como promotores, incluindo 3-fosfoglicerato quinase ou álcool oxidase, e uma origem de replicação, seqüências de terminação e similares,
15 como desejado.

Uma proteína da presente invenção, uma vez expressa, pode ser isolada a partir de leveduras lisando-se as células e aplicando-se técnicas padrão de isolamento de
20 proteínas para os lisados ou as pelotas. O monitoramento do processo de purificação pode ser conseguido usando-se técnica de *Western blot* ou radioimuno-ensaios de outras técnicas padrão de imunoensaios.

As seqüências codificando proteínas da presente
25 invenção podem ser também ligadas a vários vetores de

expressão para uso em culturas de células de transfecção, por exemplo, de origem de mamíferos, insetos, ou vegetal. Sistemas de células de mamíferos freqüentemente serão na forma de monocamadas de células, apesar de que suspensões
5 de células de mamíferos poderem ser também usadas. Numerosas linhagens de células hospedeiras adequadas capazes de expressar proteínas intactas foram desenvolvidas na técnica, e incluem as linhagens de células HEK293, BHK21, e CHO. Vetores de expressão para essas células
10 podem incluir seqüências de controle de expressão, tais como uma origem de replicação, um promotor (e.g., o promotor CMV, um promotor HSV *tk* ou *pgk* (fosfoglicerato quinase) promotor), um intensificador (Queen, et al., (1986) *Immunol. Rev.* 89:49), e sítios processadores de
15 informação necessários, tais como sítios de ligação de ribossomos, sítios de *splice* de RNA, sítios de poliadenilação (e.g., um sítio de adição SV40 T Ag poli A grande), e seqüências terminadoras de transcrição. Outras células animais úteis para produção de proteínas da
20 presente invenção são disponibilizadas, por exemplo, pelo catálogo American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (7th ed., 1992).

Vetores apropriados para expressar proteínas da
25 presente invenção em células de insetos são usualmente

derivados de bacilovirus SF9. Linhagens de células de insetos adequadas incluem linhagens de células larvas de mosquito, bicho da seda, larva de traça, traça, e *Drosophila*, tais como uma linha de células de Schneider
5 (ver, e.g., Schneider, (1987) *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27:353-65).

Como com leveduras, quando células hospedeiras de animais ou plantas superiores são empregadas, seqüências de
10 poliadenilação ou terminadoras de transcrição são tipicamente incorporadas no vetor. Um exemplo de uma seqüência terminadora é a seqüência de poliadenilação de gene de hormônio de crescimento bovino. Seqüências pra
splicing acurado do transcrito pode ser também incluídas.
15 Um exemplo de uma seqüência de *splicing* é o íntron VP1 de SV40 (Sprague, et al., (1983) *J. Virol.* 45:773-81).
Adicionalmente, seqüências gênicas para controlar a replicação na célula hospedeira podem ser incorporadas no vetor, tal como aquelas encontradas em vetores tipo vírus
20 de papiloma bovino (Saveria-Campo, "Bovine Papilloma Virus DNA a Eukaryotic Cloning Vector," in *DNA CLONING: A PRACTICAL APPROACH*, vol. II, Glover, ed., IRL Press, Arlington, VA, pp. 213-38 (1985)).

25 Além disso, o gene para ARGOS colocado no vetor de

expressão vegetal apropriado pode ser usado para transformar células vegetais. O polipeptídeo pode ser, então, isolado a partir de calos vegetais ou as células transformadas podem ser usadas para regenerar plantas transgênicas. Tais plantas transgênicas podem ser colhidas, e os tecidos apropriados (sementes ou folhas, por exemplo) podem ser sujeitos a técnicas de extração e purificação de proteína de larga escala.

10 Métodos de Transformação Vegetal

Numerosos métodos para introduzir genes estrangeiros em plantas são conhecidos e podem ser usados para inserir um polinucleotídeo ARGOS em um hospedeiro vegetal, incluindo protocolos de transformação vegetal biológicos e físicos. Ver, e.g., Miki, et al., "Procedure for Introducing Foreign DNA into Plants," in METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Glick and Thompson, eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 67-88 (1993). Os métodos escolhidos variam com a planta hospedeira, e incluem métodos de transfecção química, tal como fosfato de cálcio, transferência de genes mediada por microorganismo, tal como *Agrobacterium* (Horsch, et al., (1985) *Science* 227:1229-31), eletroporação, microinjeção, e bombardeamento biolístico.

Cassetes de expressão e vetores e métodos de cultura in vitro para transformação de célula ou tecido vegetal e regeneração de plantas são conhecidos e estão disponíveis.

5 Ver, e.g., Gruber, et al., "Vectors for Plant Transformation," in METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, supra, pp. 89-119.

Os polinucleotídeos ou polipeptídeos isolados podem
10 ser introduzidos na planta por uma ou mais técnicas tipicamente usadas para liberação direta em células. Tais protocolos podem variar dependendo do tipo de organismo, célula, planta ou célula vegetal, i.e., monocotiledônea ou dicotiledônea, visada para modificação gênica. Métodos
15 adequados de transformar células vegetais incluem microinjeção (Crossway, et al., (1986) Biotechniques 4:320-334; e U.S. Patent 6.300.543), eletroporação (Riggs, et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5602-5606, transferência direta de gene (Paszkowski, et al., (1984)
20 EMBO J. 3:2717-2722), e aceleração balística de partículas (ver, por exemplo, Sanford, et al., U.S. Patent No. 4.945.050; WO 91/10725; e McCabe, et al., (1988) Biotechnology 6:923-926). Também ver, Tomes, et al.,
25 Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells Via Microprojectile Bombardment. pp.197-213 in Plant Cell,

Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods eds. O. L. Gamborg & G.C. Phillips, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1995; U.S. Patent 5.736.369 (meristema); Weissinger, et al., (1988) Ann. Rev. Genet. 22:421-477;

5 Sanford, et al., (1987) Particulate Science and Technology 5:27-37 (cebola); Christou, et al., (1988) Plant Physiol. 87:671-674 (soja); Datta, et al., (1990) Biotechnology 8:736-740 (arroz); Klein, et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4305-4309 (milho); Klein, et al., (1988)

10 Biotechnology 6:559-563 (milho); WO 91/10725 (milho); Klein, et al., (1988) Plant Physiol. 91:440-444 (milho); Fromm, et al., (1990) Biotechnology 8:833-839; e Gordon-Kamm, et al., (1990) Plant Cell 2:603-618 (milho); Hooydaas-Van Slogteren & Hooykaas (1984) Nature (London)

15 311:763-764; Bytebier, et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5345-5349 (Liliaceae); De Wet, et al., (1985) In The Experimental Manipulation of Ovule Tissues, ed. G.P. Chapman, et al., pp. 197-209; Longman, NY (pólen); Kaeppler, et al., (1990) Plant Cell Reports 9:415-418; e

20 Kaeppler, et al., (1992) Theor. Appl. Genet. 84:560-566 (transformação mediada por fios de carbeto de silício); U.S. Patent No. 5.693.512 (sonicação); D'Halluin, et al., (1992) Plant Cell 4:1495-1505 (eletroporação); Li, et al., (1993) Plant Cell Reports 12:250-255; e Christou and Ford

25 (1995) Annals of Botany 75:407-413 (arroz); Osjoda, et al.,

(1996) Nature Biotech. 14:745-750; transformação de milho mediada por *Agrobacterium* (U.S. Patent 5.981.840); métodos de fios de carbeto de silício (Frame, et al., (1994) Plant J. 6:941-948); métodos a laser (Guo, et al., (1995) 5 *Physiologia Plantarum* 93:19-24); métodos de sonicação (Bao, et al., (1997) *Ultrasound in Medicine & Biology* 23:953-959; Finer and Finer (2000) *Lett Appl Microbiol.* 30:406-10; Amoah, et al., (2001) *J Exp Bot* 52:1135-42); métodos de polietileno glicol (Krens, et al., (1982) *Nature* 296:72- 10 77); protoplastos de células de monocotiledôneas e dicotiledôneas podem ser transformados usando eletroporação (Fromm, et al., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5824-5828) e microinjeção (Crossway, et al., (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202:179-185); todos os quais são aqui incorporados 15 por referência.

Transformação mediada por *Agrobacterium*

O método mais amplamente utilizado para introduzir um 20 vetor de expressão em plantas é baseado no sistema de transformação natural de *Agrobacterium*. *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* são bactérias de solo patogênicas de plantas, que transformam geneticamente células vegetais. Os plasmídeos Ti e Ri de *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, 25 respectivamente, carregam genes responsáveis pela

transformação genética de plantas. Ver, e.g., Kado, (1991) *Crit. Rev. Plant Sci.* 10:1. Descrições dos sistemas vetores de *Agrobacterium* e métodos para transferência de gene mediada por *Agrobacterium* são providos em Gruber, et al., supra; Miki, et al., supra; and Moloney, et al., (1989) *Plant Cell Reports* 8:238.

Similarmente, o gene pode ser inserido na região T-DNA de um plasmídeo Ti ou Ri derivado de *A. tumefaciens* ou *A. rhizogenes*, respectivamente. Assim, cassetes de expressão podem ser construídos como acima, usando esses plasmídeos. Várias seqüências controle são conhecidas, as quais, quando combinadas com uma seqüência codificadora heteróloga e transformadas em um organismo hospedeiro, apresentam fidelidade em expressão gênica em relação a especificidade de tecido/órgão da seqüência codificadora original. Ver, e.g., Benfey and Chua, (1989) *Science* 244:174-81. Particularmente seqüências controle adequadas para uso nesses plasmídeos são promotores para expressão constitutiva específica de folha do gene nas várias plantas alvo. Outras seqüências controle úteis incluem um promotor e um terminador do gene de nopalina sintase (NOS). O promotor e terminador de NOS estão presentes no plasmídeo pARC2, disponibilizado pela American Type Culture Collection e designado ATCC 67238. Se tal sistema é usado,

o gene de virulência (vir) tanto do plasmídeo Ti ou Ri devem estar também presentes, tanto junto com a porção T-DNA, ou via um sistema binário aonde o gene vir está presente em um vetor separado. Tais sistemas, vetores para
5 uso desta forma, e métodos de transformar células vegetais são descritos na patente US No. 4.658.082; Pedido de patente US No. 913.914, preenchida em 1º de outubro de 1986, como referenciado na Patente US No. 5.262.306, emitida em 16 de novembro de 1993; e Simpson, et al.,
10 (1986) *Plant Mol. Biol.* 6:403-15 (também referenciado na patente '306); todas incorporadas por referência em sua íntegra.

Uma vez construídos, esses plasmídeos podem ser
15 colocados em *A. rhizogenes* ou *A. tumefaciens* e esses vetores usados para transformar células de espécies vegetais, as quais são ordinariamente suscetíveis a infecção por *Fusarium* ou *Alternaria*. Diversas outras plantas transgênicas são também contempladas pela presente
20 invenção incluindo, mas não se limitando a, soja, milho, sorgo, alfafa, arroz trevo, repolho, banana, café, aipo, tabaco, caupi, algodão, melão e pimenta. A seleção tanto de *A. tumefaciens* ou *A. rhizogenes* dependerá da planta sendo transformado dessa forma. Em geral, *A. tumefaciens* é
25 o organismo preferido para transformação. A maioria das

plantas dicotiledôneas, algumas gimnospermas e algumas poucas plantas monocotiledôneas (e.g., certos membros de *Liliales* e *Arales*) são suscetíveis a infecção com *A. tumefaciens*. *A. rhizogenes* também possui uma ampla
5 variedade de hospedeiros, abrangendo a maioria das dicotiledôneas e algumas gimnospermas, o que inclui membros das *Leguminosae*, *Compositae*, e *Chenopodiaceae*. Plantas monocotiledôneas podem ser agora transformadas com algum sucesso. O pedido de patente européia No. 604 662 A1
10 descreve um método para transformar monocotiledôneas usando *Agrobacterium*. O pedido de patente européia No. 672 752 A1 descreve um método para transformar monocotiledôneas com *Agrobacterium* usando o escutelo de embriões imaturos. Ishida, et al., discutem um método para transformar milho
15 expondo embriões imaturos a *A. tumefaciens* (*Nature Biotechnology* 14:745-50 (1996)).

Uma vez transformadas, essas células podem ser usadas para regenerar plantas transgênicas. Por exemplo, plantas
20 inteiras podem ser infectadas com esses vetores ferindo a planta e, então, introduzindo o vetor no local do ferimento. Qualquer parte da planta pode ser ferida, incluindo folhas, caules e raízes. Alternativamente, tecido vegetal, na forma de um explante, tal como tecido
25 dos cotilédones ou discos foliares, pode ser inoculado com

esses vetores, e cultivado sob condições que promove a regeneração vegetal. Raízes ou brotos transformados por inoculação de tecido vegetal com *A. rhizogenes* ou *A. tumefaciens*, contendo o gene codificando a enzima de
5 degradação de fumonisina, podem ser usados como fonte de tecido vegetal para regenerar plantas transgênicas resistentes a fumonisina, tanto via embriogênese somática ou organogênese. Exemplos de tais métodos para regenerar tecido vegetal são descritos em Shahin, *Theor. Appl. Genet.*
10 69:235-40 (1985); Patente US No. 4.658.082; Simpson, et al., *supra*; e Pedido de patente US Nos. 913.913 e 913.914, ambas preenchidas em 1º de outubro de 1986, como referenciado em Patente US No. 5.262.306, emitida em 16 de novembro de 1993, todas as descrições dessas incorporadas
15 aqui por referência.

Transferência Direta de Gene

Apesar do fato de que a variedade de hospedeiros para transformação mediada por *Agrobacterium* ser ampla, algumas
20 principais espécies de culturas e gimnospermas foram geralmente recalcitrantes a esse modo de transferência de genes, apesar de que algum sucesso ter sido recentemente alcançado em arroz (Hiei, et al., (1994) *The Plant Journal* 6:271-82). Diversos métodos de transformação vegetal,
25 coletivamente referidos como transferência direta de gene,

foram desenvolvidos como uma alternativa para transformação mediada por *Agrobacterium*.

Um método geralmente aplicável de transformação
5 vegetal é a transformação mediada por microprojétil, onde
DNA é carregado na superfície de microprojéteis medindo
cerca de 1 a 4 μm . O vetor de expressão é introduzido em
tecidos vegetais com um dispositivo biolístico que acelera
os microprojéteis a velocidades de 300 a 600 m/s, o que é
10 suficiente para penetrar as paredes e membranas celulares
de células vegetais (Sanford, et al., (1987) *Plant. Sci. Technol.* 5:27; Sanford, (1988) *Trends Biotech* 6:299; Sanford, (1990) *Physiol. Plant* 79:206; and Klein, et al., (1992) *Biotechnology* 10:268).

15

Outro método para liberação de DNA para plantas é a
sonicação de células alvo como descrito em Zang, et al.,
(1991) *BioTechnology* 9:996. Alternativamente, fusões de
lipossomos ou esferoplastos foram usadas para introduzir
20 vetores de expressão em plantas. Ver, e.g., Deshayes, et
al., (1985) *EMBO J.* 4:2731; e Christou, et al., (1987)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3962. A absorção direta de
DNA em protoplastos usando precipitação de CaCl_2 , álcool
polivinil, ou poli-L-ornitina, foi também relatada. Ver,

e.g., Hain, et al., (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199:161; e Draper, et al., (1982) *Plant Cell Physiol.* 23:451.

A eletroporação de protoplastos e células e tecidos
5 inteiros foi também descrita. Ver, e.g., Donn, et al.,
(1990) in *Abstracts of the VIIth Int'l. Congress on Plant
Cell and Tissue Culture IAPTC*, A2-38, p. 53; D'Halluin, et
al., (1992) *Plant Cell* 4:1495-505; e Spencer, et al.,
(1994) *Plant Mol. Biol.* 24:51-61.

10

Aumentando a atividade e/ou nível de um polipeptídeo ARGOS

Métodos são providos para aumentar a atividade e/ou
nível do polipeptídeo ARGOS da invenção. Um aumento no
15 nível e/ou atividade do polipeptídeo ARGOS da invenção pode
ser conseguido fornecendo à planta um polipeptídeo ARGOS.
O polipeptídeo ARGOS pode ser provido introduzindo a
seqüência de aminoácidos codificando o polipeptídeo ARGOS
na planta, introduzindo na planta uma seqüência de
20 nucleotídeos codificando um polipeptídeo ARGOS ou
alternativamente modificando um locus genômico codificando
o polipeptídeo ARGOS da invenção.

Como aqui discutido em outra parte, vários métodos são
25 conhecidos na técnica para prover um polipeptídeo a uma

planta incluindo, mas não se limitando a, introdução direta do polipeptídeo na planta, introduzindo na planta (transientemente ou estavelmente) uma construção de polinucleotídeo codificando um polipeptídeo tendo atividade reguladora de número de células. É também reconhecido que os métodos da invenção podem empregar um polinucleotídeo que não é capaz de dirigir, na planta transformada, a expressão de uma proteína ou um RNA. Assim, o nível e/ou atividade de um polipeptídeo ARGOS pode ser aumentado alterando-se o gene codificando o polipeptídeo ARGOS ou seu promotor. Ver, e.g., Kmiec, U.S. Patent 5.565.350; Zarling, *et al.*, PCT/US93/03868. Portanto, são providas plantas mutagenizadas que carregam mutações em genes ARGOS, onde as mutações aumentam a expressão do gene ARGOS ou aumenta a atividade de crescimento vegetal e/ou desenvolvimento de órgão do polipeptídeo ARGOS codificado.

Reduzindo a atividade e/ou nível de um polipeptídeo ARGOS

Métodos são providos para reduzir ou eliminar a atividade de um polipeptídeo ARGOS da invenção transformando uma célula vegetal com um cassete de expressão que expressa um polinucleotídeo que inibe a expressão do polipeptídeo ARGOS. O polinucleotídeo pode inibir a expressão do polipeptídeo ARGOS diretamente

prevenindo a tradução do RNA mensageiro de ARGOS, ou indiretamente codificando um polipeptídeo que inibe a transcrição ou tradução de um gene ARGOS codificando um polipeptídeo ARGOS. Métodos para inibir ou eliminar a
5 expressão de um gene em uma planta são bem conhecidos na técnica, e qualquer tal método pode ser usado na presente invenção para inibir a expressão de um polipeptídeo ARGOS.

De acordo com a presente invenção, a expressão de um
10 polipeptídeo ARGOS é inibida se o nível de proteína do polipeptídeo ARGOS é menos do que 70% do nível de proteína do mesmo polipeptídeo ARGOS em uma planta que não foi geneticamente modificada ou mutagenizada para inibir a expressão daquele polipeptídeo ARGOS. Em avanços da
15 invenção em particular, o nível de proteína do polipeptídeo ARGOS em uma planta modificada de acordo com a invenção é de menos de 60%, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20%, menos de 10%, menos de 5% ou menos de 2% do nível de proteína do mesmo polipeptídeo ARGOS em uma planta
20 que não é uma mutante ou que não foi geneticamente modificada para inibir a expressão daquele polipeptídeo ARGOS. O nível de expressão do polipeptídeo ARGOS pode ser medido diretamente, por exemplo, testando o nível de polipeptídeo ARGOS expresso na célula vegetal ou planta, ou
25 indiretamente, por exemplo, medindo a atividade de

crescimento vegetal e/ou desenvolvimento de órgão do polipeptídeo ARGOS na célula vegetal ou planta, ou medindo a biomassa na planta. Métodos para efetuar tais testes são aqui descritos em outra parte.

5

Em outros avanços da invenção, a atividade dos polipeptídeos ARGOS é reduzida ou eliminada transformando uma célula vegetal com um cassete de expressão compreendendo um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo que inibe a atividade de um polipeptídeo ARGOS. A atividade de crescimento vegetal e/ou desenvolvimento de órgão de um polipeptídeo ARGOS é inibida de acordo com a presente invenção de a atividade de crescimento vegetal e/ou desenvolvimento de órgão do polipeptídeo ARGOS é menos do que 70% da atividade de crescimento vegetal e/ou desenvolvimento de órgão do mesmo polipeptídeo ARGOS em uma planta que não foi modificada para inibir a atividade de crescimento vegetal e/ou desenvolvimento de órgão daquele polipeptídeo ARGOS. Em avanços particulares da invenção, a atividade de crescimento vegetal e/ou desenvolvimento de órgão do polipeptídeo ARGOS em uma planta modificada de acordo com a invenção é de menos do que 60%, menos do que 50%, menos do que 40%, menos do que 30%, menos do que 20%, menos do que 10%, ou menos do que 5% da atividade de crescimento vegetal

e/ou desenvolvimento de órgão do mesmo polipeptídeo ARGOS em uma planta que não foi modificada para inibir a expressão daquele polipeptídeo ARGOS. A atividade de crescimento vegetal e/ou desenvolvimento de órgão de um polipeptídeo ARGOS é "eliminada" de acordo com a invenção quando não é detectável pelos métodos de teste aqui descritos em outra parte. Métodos de determinar a atividade de crescimento vegetal e/ou desenvolvimento de órgão de um polipeptídeo ARGOS são aqui descritos em outra parte.

Em outros avanços, a atividade de um polipeptídeo ARGOS pode ser reduzida ou eliminada rompendo-se o gene codificando o polipeptídeo ARGOS. A invenção engloba plantas mutagenizadas que carregam mutações em genes ARGOS, onde as mutações reduzem a expressão do gene ARGOS ou inibem a atividade de crescimento vegetal e/ou desenvolvimento de órgão do polipeptídeo ARGOS codificado.

Assim, vários métodos podem ser usados para reduzir ou eliminar a atividade de um polipeptídeo ARGOS. Além disso, mais de um método pode ser usado para reduzir a atividade de um único polipeptídeo ARGOS. Exemplos não limitantes de métodos de reduzir ou eliminar a expressão de polipeptídeos ARGOS são dados abaixo.

1. *Métodos Baseados em Polinucleotídeos:*

Em alguns avanços da presente invenção, uma planta é transformada com um cassete de expressão que é capaz de expressar um polinucleotídeo que inibe a expressão de um polipeptídeo ARGOS da invenção. O termo "expressão", como aqui usado, refere-se à biossíntese de um produto gênico, incluindo a transcrição e/ou tradução de dito produto gênico. Por exemplo, para os propósitos da presente invenção, um cassete de expressão capaz de expressar um polinucleotídeo que inibe a expressão de pelo menos um polipeptídeo ARGOS é um cassete de expressão capaz de produzir uma molécula de RNA que inibe a transcrição e/ou tradução de pelo menos um polipeptídeo ARGOS da invenção. A "expressão" ou "produção" de uma proteína ou polipeptídeo a partir de uma molécula de DNA refere-se à transcrição e tradução da sequência codificadora para produzir a proteína ou polipeptídeo, enquanto que "expressão" ou "produção" de uma proteína ou polipeptídeo a partir de uma molécula de RNA refere-se à tradução da sequência de RNA codificadora para produzir a proteína ou polipeptídeo.

Exemplos de polinucleotídeos que inibem a expressão de um polipeptídeo ARGOS são dados abaixo.

i. Supressão/Co-supressão senso

Em alguns avanços da invenção, a inibição da expressão
5 de um polipeptídeo ARGOS pode ser obtida por supressão ou
co-supressão senso. Para co-supressão, um cassete de
expressão é projetado para expressar uma molécula de RNA
correspondendo a todo ou parte de um RNA mensageiro
codificando um polipeptídeo ARGOS na orientação "senso". A
10 super-expressão da molécula de RNA pode resultar em
expressão reduzida do gene nativo. Dessa maneira,
múltiplas linhas vegetais transformadas com o cassete de
expressão de co-supressão são rastreadas para se
identificar aquelas que apresentam a maior inibição de
15 expressão de polipeptídeo ARGOS.

O polinucleotídeo usado para co-supressão pode
corresponder a toda ou parte da sequência codificando o
polipeptídeo ARGOS, toda ou parte da região não traduzida
20 5' e/ou 3' de um transcrito de polipeptídeo ARGOS, ou toda
ou parte de ambas sequência codificadora e regiões não
traduzidas de um transcrito codificando um polipeptídeo
ARGOS. Em alguns avanços onde o polinucleotídeo compreende
toda ou parte da região codificadora para o polipeptídeo
25 ARGOS, o cassete de expressão é projetado para eliminar o

códon de iniciação do polinucleotídeo de forma que nenhum produto de proteína seja traduzido.

Co-supressão pode ser usada para inibir a expressão de
5 genes vegetais para produzir plantas tendo níveis proteína
indetectáveis para as proteínas codificadas por esses
genes. Ver, por exemplo, Broin, et al., (2002) *Plant Cell*
14:1417-1432. A co-supressão pode ser também usada para
inibir a expressão de múltiplas proteínas na mesma planta.
10 Ver, por exemplo, U.S. Patent No. 5.942.657. Métodos para
usar co-supressão para inibir a expressão de genes
endógenos em plantas são descritos em Flavell, et al.,
(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3490-3496; Jorgensen,
et al., (1996) *Plant Mol. Biol.* 31:957-973; Johansen and
15 Carrington (2001) *Plant Physiol.* 126:930-938; Broin, et
al., (2002) *Plant Cell* 14:1417-1432; Stoutjesdijk, et al.,
(2002) *Plant Physiol.* 129:1723-1731; Yu, et al., (2003)
Phytochemistry 63:753-763; e U.S. Patent Nos. 5.034.323,
5.283.184, e 5.942.657; cada qual é aqui incorporada por
20 referência. A eficiência de co-supressão pode ser
aumentada incluindo uma região poli-dT no cassete de
expressão na posição 3' em relação à sequência senso e 5'
do sinal de poliadenilação. Ver, U.S. Patent Publication
No. 20020048814, aqui incorporada por referência.
25 Tipicamente, tal sequência de nucleotídeos possui

identidade de sequência substancial em relação à sequência do transcrito do gene endógeno, otimamente maior do que cerca de 65% de identidade de sequência, mais otimamente maior do que cerca de 85% de identidade de sequência, 5 otimamente maior do que cerca de 95% de identidade de sequência. Ver U.S. Patent Nos. 5.283.184 e 5.034.323; aqui incorporadas por referência.

ii. Supressão Anti-senso

10

Em alguns avanços da invenção, a inibição da expressão do polipeptídeo ARGOS pode ser obtida por supressão anti-senso. Para supressão anti-senso, o cassete de expressão é projetado para expressar uma molécula de RNA complementar a 15 todo ou parte de um RNA mensageiro codificando o polipeptídeo ARGOS. Super-expressão da molécula de RNA anti-senso pode resultar em expressão reduzida do gene nativo. Dessa maneira, múltiplas linhas vegetais com o cassete de expressão de supressão anti-senso são rastreadas 20 para se identificar aqueles que apresentam a maior inibição de expressão de polipeptídeo ARGOS.

O polinucleotídeo para uso em supressão anti-senso pode corresponder a todo ou parte do complemento da 25 sequência codificando o polipeptídeo ARGOS, todo ou parte

do complemento da região não traduzida 5' e/ou 3' do transcrito ARGOS, ou todo ou parte do complemento de ambas sequência codificadora e regiões não traduzidas de um transcrito codificando o polipeptídeo ARGOS. Além disso, o

5 polinucleotídeo anti-senso pode ser totalmente complementar (i.e., 100% idêntico ao complemento da sequência alvo) ou parcialmente complementar (i.e., menos de 100% idêntico ao complemento da sequência alvo) em relação à sequência alvo. Supressão anti-senso pode ser usada para inibir a expressão

10 de múltiplas proteínas na mesma planta. Ver, por exemplo, U.S. Patent No. 5.942.657. Adicionalmente, porções dos nucleotídeos anti-senso podem ser usadas para romper a expressão do gene alvo. Geralmente, sequências de pelo menos 50 nucleotídeos, 100 nucleotídeos, 200 nucleotídeos,

15 300, 400, 450, 500, 550 ou maiores podem ser usadas. Métodos para usar supressão anti-senso para inibir a expressão de genes endógenos em plantas são descritos, por exemplo, em Liu, et al., (2002) *Plant Physiol.* 129:1732-1743 e U.S. Patent Nos. 5.759.829 e 5.942.657, cada qual é

20 aqui incorporada por referência. A eficiência de supressão anti-senso pode ser aumentada incluindo uma região poli-dT no cassete de expressão em uma posição 3' em relação à sequência anti-senso e 5' do sinal de poliadenilação. Ver, U.S. Patent Publication No. 20020048814, aqui incorporada

25 por referência.

iii. Interferência de RNA de Dupla-Fita

Em alguns avanços da invenção, a inibição da expressão
5 de um polipeptídeo ARGOS pode ser obtida por interferência
de RNA de dupla-fita (dsRNA). Para interferência de dsRNA,
uma molécula de RNA senso como aquela descrita acima para
co-supressão e uma molécula de RNA anti-senso, que é
totalmente ou parcialmente complementar à molécula de RNA
10 senso, são expressas na mesma célula, resultando em
inibição da expressão do RNA mensageiro endógeno
correspondente.

A expressão das moléculas senso e anti-senso pode ser
15 conseguida projetando o cassete de expressão para
compreender tanto uma seqüência senso e uma seqüência anti-
senso. Alternativamente, cassetes de expressão separados
podem ser usados para as seqüências senso e anti-senso.
Múltiplas linhas vegetais transformadas com o cassete de
20 expressão de interferência de dsRNA, ou cassetes de
expressão, são, então, rastreadas para se identificar
linhas vegetais que apresentam a maior inibição de
expressão de polipeptídeo ARGOS. Métodos para usar
interferência de dsRNA para inibir a expressão de genes
25 vegetais endógenos são descritos em Waterhouse, et al.,

(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13959-13964, Liu, et al., (2002) *Plant Physiol.* 129:1732-1743, e WO 99/49029, WO 99/53050, WO 99/61631, e WO 00/49035; cada qual é aqui incorporada por referência.

5

iv. Interferência de RNA Hairpin e Interferência de RNA Hairpin Contendo Íntron

Em alguns avanços da invenção, a inibição da expressão
10 de um polipeptídeo ARGOS pode ser obtida por interferência de RNA *hairpin* (hpRNA) ou interferência de RNA *hairpin* contendo íntron (ihpRNA). Esses métodos são altamente altamente eficientes em inibir a expressão de genes endógenos. Ver, Waterhouse and Helliwell (2003) *Nat. Rev.*
15 *Genet.* 4:29-38 e as referências aí citadas.

Para interferência de hpRNA, o cassete de expressão é projetado para expressar uma molécula de RNA que hibridiza a si mesma para formar uma estrutura *hairpin* que compreende
20 uma região *loop* de fita simples e uma ramificação base-pareada. A região de ramificação base-pareada compreende uma sequência senso correspondendo a todo ou parte do RNA mensageiro endógeno codificando o gene cuja expressão deve ser inibida, e uma sequência anti-senso que é totalmente ou
25 parcialmente complementar à sequência senso. Assim, a

região de ramificação base-pareada da molécula geralmente determina a especificidade da interferência de RNA. Moléculas de hpRNA são altamente eficientes em inibir a expressão de genes endógenos, e a interferência de RNA que
5 induzem é herdada por subseqüentes gerações de plantas. Ver, por exemplo, Chuang and Meyerowitz (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4985-4990; Stoutjesdijk, et al., (2002) *Plant Physiol.* 129:1723-1731; e Waterhouse and Helliwell (2003) *Nat. Rev. Genet.* 4:29-38. Métodos para usar
10 interferência de hpRNA para inibir ou silenciar a expressão de genes são descritos, por exemplo, em Chuang and Meyerowitz (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4985-4990; Stoutjesdijk, et al., (2002) *Plant Physiol.* 129:1723-1731; Waterhouse and Helliwell (2003) *Nat. Rev. Genet.* 4:29-38;
15 Pandolfini, et al., *BMC Biotechnology* 3:7, e U.S. Patent Publication No. 20030175965; cada qual é aqui incorporada por referência. Um teste transiente para a eficiência de construções de hpRNA em silenciar a expressão gênica *in vivo* foi descrito por Panstruga, et al., (2003) *Mol. Biol.*
20 *Rep.* 30:135-140, aqui incorporado por referência.

Para ihpRNA, as moléculas interferentes possuem a mesma estrutura geral como para hpRNA, mas a molécula de RNA compreende, adicionalmente, um íntron que é capaz de
25 sofrer *splicing* na célula na qual o ihpRNA é expresso. O

uso de um íntron minimiza o tamanho do *loop* na molécula de RNA *hairpin* após *splicing*, e isso aumenta a eficiência de interferência. Ver, por exemplo, Smith, et al., (2000) *Nature* 407:319-320. De fato, Smith, et al., apresentam
5 100% de supressão de expressão de gene endógeno usando interferência mediada por *ihpRNA*. Métodos para usar interferência de *ihpRNA* para inibir a expressão de genes vegetais endógenos são descritos, por exemplo, em Smith, et al., (2000) *Nature* 407:319-320; Wesley, et al., (2001)
10 *Plant J.* 27:581-590; Wang and Waterhouse (2001) *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:146-150; Waterhouse and Helliwell (2003) *Nat. Rev. Genet.* 4:29-38; Helliwell and Waterhouse (2003) *Methods* 30:289-295, e U.S. Patent Publication No. 20030180945, cada qual é aqui incorporada por referência.

15

O cassete de expressão para interferência de *hpRNA* pode ser também projetado de forma que a sequência *senso* e a sequência *anti-senso* não correspondam a um RNA endógeno. Neste avanço, a sequência *senso* e a sequência *anti-senso*
20 flanqueiam uma sequência *loop* que compreende uma sequência de nucleotídeos correspondendo a todo ou parte do RNA mensageiro endógeno do gene alvo. Assim, é a região *loop* que determina a especificidade da interferência de RNA. Ver, por exemplo, WO 02/00904, aqui incorporada por
25 referência.

v. *Interferência mediada por Amplicon*

Cassetes de expressão *amplicon* compreendem uma
5 sequência vegetal derivada de vírus que contém todo ou
parte do gene alvo, mas que geralmente não todos os genes
do vírus nativo. As seqüências virais presentes no produto
de transcrição do cassete de expressão permitem que o
produto de transcrição direcione sua própria replicação.
10 Os transcritos produzidos pelo *amplicon* podem ser tanto
senso ou anti-senso em relação à seqüência alvo (i.e., o
RNA mensageiro para o polipeptídeo ARGOS). Métodos de usar
amplicons para inibir a expressão de genes vegetais
endógenos são descritos, por exemplo, em Angell and
15 Baulcombe (1997) *EMBO J.* 16:3675-3684, Angell and Baulcombe
(1999) *Plant J.* 20:357-362, e U.S. Patent No. 6.646.805,
cada qual é aqui incorporada por referência.

vi. *Ribozimas*

20

Em alguns avanços, o polinucleotídeo expresso pelo
cassete de expressão da invenção é RNA catalítico ou possui
atividade de ribozima específica para o RNA mensageiro do
polipeptídeo ARGOS. Assim, o polinucleotídeo causa a
25 degradação do RNA mensageiro endógeno, resultando em

expressão reduzida do polipeptídeo ARGOS. Esse método é descrito, por exemplo, em U.S. Patent No. 4.987.071, aqui incorporada por referência.

5 vii. RNA de interferência pequeno ou Micro RNA

Em alguns avanços da invenção, a inibição da expressão de um polipeptídeo ARGOS pode ser obtida por interferência de RNA pela expressão de um gene codificando um micro RNA (miRNA). miRNAs são agentes reguladores consistindo de
10 cerca de 22 ribonucleotídeos. miRNAs são altamente eficientes em inibir a expressão de genes endógenos. Ver, por exemplo, Javier, et al., (2003) *Nature* 425:257-263, aqui incorporado por referência.

15

Para interferência de miRNA, o cassete de expressão é projetado para expressar uma molécula de RNA que é modelada em um gene de miRNA endógeno. O gene miRNA codifica um RNA que forma uma estrutura *hairpin* contendo uma sequência de
20 22 nucleotídeos que é complementar a outro gene endógeno (sequência alvo). Para supressão da expressão de ARGOS, a sequência de 22 nucleotídeos é selecionada de uma sequência de transcrito ARGOS e contém 22 nucleotídeos de dita sequência ARGOS na orientação senso e 21 nucleotídeos de
25 uma sequência anti-senso correspondente que é complementar.

à sequência senso. Moléculas de miRNA são altamente eficientes em inibir a expressão de genes endógenos, e a interferência de RNA que induzem é herdada por subseqüentes gerações de plantas.

5

2. *Inibição de Expressão Gênica baseada em Polipeptídeo*

Em um avanço, o polinucleotídeo codifica uma proteína
10 dedo de zinco que se liga a um gene codificando um polipeptídeo ARGOS, resultando em expressão reduzida do gene. Em avanços em particular, a proteína dedo de zinco se liga a uma região reguladora de um gene ARGOS. Em outros avanços, a proteína dedo de zinco se liga a um RNA
15 mensageiro codificando um polipeptídeo ARGOS e previne sua tradução. Métodos de selecionar sítios para direcionamento por proteínas dedo de zinco foram descritos, por exemplo, em U.S. Patent No. 6.453.242, e métodos para usar proteínas dedo de zinco para inibir a expressão de genes em plantas
20 são descritos, por exemplo, em U.S. Patent Publication No. 20030037355; cada qual é aqui incorporada por referência.

3. *Inibição de Atividade de Proteína baseada em Polipeptídeo*

25

Em alguns avanços da invenção, o polinucleotídeo codifica um anticorpo que se liga a pelo menos um polipeptídeo ARGOS, e reduz a atividade reguladora de número de células do polipeptídeo ARGOS. Em outro avanço, a ligação do anticorpo resulta em recuperação aumentada do complexo anticorpo-ARGOS por mecanismos celulares de controle de qualidade. A expressão de anticorpos em células vegetais e a inibição de vias moleculares por expressão e ligação de anticorpos a proteínas em células vegetais são bem conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Conrad and Sonnewald (2003) *Nature Biotech.* 21:35-36, aqui incorporada por referência.

4. *Rompimento de Gene*

15

Em alguns avanços da presente invenção, a atividade de um polipeptídeo ARGOS é reduzida ou eliminada rompendo o gene codificando o polipeptídeo ARGOS. O gene codificando o polipeptídeo ARGOS pode ser rompido por qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, em um avanço, o gene é rompido por marcação de *transposon*. Em outro avanço, o gene é rompido mutagenizando plantas usando mutagênese aleatória ou direcionada, e selecionando plantas que possuem atividade reguladora de número de células reduzida.

25

i. Marcação de Transposon

Em um avanço da invenção, marcação de *transposon* é usada para reduzir ou eliminar a atividade de ARGOS de um ou mais polipeptídeos ARGOS. Marcação de *transposon* compreende inserir um *transposon* com um gene ARGOS endógeno para reduzir ou eliminar a expressão do polipeptídeo ARGOS. "Gene ARGOS" deve significar o gene que codifica um polipeptídeo ARGOS de acordo com a invenção.

10

Neste avanço, a expressão de um ou mais polipeptídeos ARGOS é reduzida ou eliminada inserindo um *transposon* em uma região reguladora ou região codificadora do gene codificando o polipeptídeo ARGOS. Um *transposon* que está em um éxon, íntron, sequência não traduzida 5' ou 3', um promotor, ou qualquer outra sequência reguladora de um gene ARGOS pode ser usado para reduzir ou eliminar a expressão e/ou atividade do polipeptídeo ARGOS codificado.

20

Métodos para a marcação por *transposon* de genes específicos em plantas são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Maes, et al., (1999) *Trends Plant Sci.* 4:90-96; Dharmapuri and Sonti (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 179:53-59; Meissner, et al., (2000) *Plant J.* 22:265-274; Phogat, et al., (2000) *J. Biosci.* 25:57-63; Walbot (2000)

25

Curr. Opin. Plant Biol. 2:103-107; Gai, et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:94-96; Fitzmaurice, et al., (1999) *Genetics* 153:1919-1928). Além disso, o processo TUSC para selecionar inserções Mu em genes selecionados foi descrito em Bensen, et al., (1995) *Plant Cell* 7:75-84; Mena, et al., (1996) *Science* 274:1537-1540; e U.S. Patent No. 5.962.764; cada qual é aqui incorporada por referência.

ii. *Plantas Mutantes com Atividade Reduzida*

10

Métodos adicionais para diminuir ou eliminar a expressão de genes endógenos em plantas são também conhecidos na técnica e podem ser similarmente aplicados à atual invenção. Esses métodos incluem outras formas de mutagênese, tais como mutagênese induzida por etil metanossulfonato, mutagênese por deleção, e mutagênese por deleção rápida de nêutron usada em um senso genético reverso (com PCR) para identificar linhas vegetais nas quais o gene endógeno foi deletado. Para exemplos desses métodos, ver Ohshima, et al., (1998) *Virology* 243:472-481; Okubara, et al., (1994) *Genetics* 137:867-874; e Quesada, et al., (2000) *Genetics* 154:421-436; cada qual é aqui incorporado por referência. Além disso, um método rápido e automático para rastrear mutações induzidas quimicamente, TILLING (*Targeting Induced Local Lesions In Genomes*),

25

usando HPLC desnaturante ou digestão seletiva de endonuclease de produtos de PCR selecionados é também aplicável à autal invenção. Ver, McCallum, et al., (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:455-457, aqui incorporada por
5 referência.

Mutações que causam impacto na expressão gênica ou que interferem com a função (atividade reguladora de número de células) da proteína codificada são bem conhecidas na
10 técnica. Mutações de inserção em éxons gênicos usualmente resultam em mutantes nulos. Mutações em resíduos conservados são particularmente efetivas em inibir a atividade reguladora de número de células da proteína codificada. Resíduos conservados de polipeptídeos vegetais
15 ARGOS adequados para mutagênese com a meta de eliminar a atividade reguladora de número de células foram descritos. Tais mutantes podem ser isolados de acordo com procedimentos bem conhecidos, e mutações em diferentes loci ARGOS podem ser combinados por cruzamento genético. Ver,
20 por exemplo, Gruis, et al., (2002) *Plant Cell* 14:2863-2882.

Em outro avanço desta invenção, mutantes dominantes podem ser usados para iniciar o silenciamento de RNA devido à inversão gênica e recombinação de um locus gênico

duplicado. Ver, por exemplo, Kusaba, et al., (2003) *Plant Cell* 15:1455-1467.

A invenção engloba métodos adicionais para reduzir ou
5 eliminar a atividade de um ou mais polipeptídeos ARGOS.
Exemplos de outros métodos para alterar ou mutar uma
seqüência de nucleotídeos genômica em uma planta são
conhecidos na técnica e incluem, mas não são limitados a, o
uso de vetores RNA:DNA, vetores mutacionais RNA:DNA,
10 vetores de reparo RNA:DNA, oligonucleotídeos misturados
duplos, oligonucleotídeos RNA:DNA autocomplementares, e
oligonucleobases recombinogênicas. Tais vetores e métodos
de uso são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, U.S.
Patent Nos. 5.565.350; 5.731.181; 5.756.325; 5.760.012;
15 5.795.972; e 5.871.984; cada qual é aqui incorporada por
referência. Ver também, WO 98/49350, WO 99/07865, WO
99/25821, e Beetham, et al., (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA 96:8774-8778; cada qual é aqui incorporada por
referência.

20

*iii. Atividade moduladora de crescimento vegetal
e/ou desenvolvimento de órgão*

Em métodos específicos, o nível e/ou atividade de um
25 regulador de número de células em uma planta é aumentado

elevando-se o nível ou atividade do polipeptídeo ARGOS na planta. Métodos para elevar o nível e/ou atividade de polipeptídeos ARGOS em uma planta são aqui discutidos em outra parte. Resumidamente, tais métodos compreendem
5 prover um polipeptídeo ARGOS da invenção a uma planta e, dessa forma, aumentar o nível e/ou atividade do polipeptídeo ARGOS. Em outros avanços, uma sequência de nucleotídeos ARGOS codificando um polipeptídeo ARGOS pode ser provida introduzindo-se na planta um polinucleotídeo
10 compreendendo uma sequência de nucleotídeos ARGOS da invenção, expressando a sequência ARGOS, aumentando a atividade do polipeptídeo ARGOS, e, dessa forma, elevando o número de células de tecido na planta ou parte de planta. Em outros avanços, o construção de nucleotídeos ARGOS
15 introduzido na planta é estavelmente incorporado no genoma da planta.

Em outros métodos, o número de células e biomassa de um tecido vegetal é aumentado elevando-se o nível e/ou
20 atividade do polipeptídeo ARGOS na planta. Tais métodos são aqui descritos em detalhe em outra parte. Em um método, uma sequência de nucleotídeos de ARGOS é introduzida na planta e a expressão de dita sequência de nucleotídeos de ARGOS diminui a atividade do polipeptídeo
25 ARGOS, e, dessa forma, o crescimento vegetal e/ou

desenvolvimento de órgão na planta ou parte de planta. Em outros avanços, a construção de nucleotídeo ARGOS introduzida na planta é estavelmente incorporado no genoma da planta.

5

Como discutido acima, um especialista reconhecerá o promotor apropriado para uso para modular o nível/atividade de um polinucleotídeo e polipeptídeo de crescimento vegetal e/ou desenvolvimento de órgão na planta. Promotores
10 exemplares para este avanço foram aqui descritos em outra parte.

Dessa maneira, a presente invenção provê ainda plantas tendo um crescimento vegetal e/ou desenvolvimento de órgão
15 modificado quando comparado ao crescimento vegetal e/ou desenvolvimento de órgão de um tecido vegetal controle. Em um avanço, a planta da invenção possui um nível/atividade elevado do polipeptídeo ARGOS da invenção e, assim, possui crescimento vegetal e/ou desenvolvimento de órgão aumentado
20 no tecido vegetal. Em outros avanços, a planta da invenção possui um nível reduzido ou eliminado do polipeptídeo ARGOS da invenção e, assim, possui crescimento vegetal e/ou desenvolvimento de órgão reduzido no tecido vegetal. Em outros avanços, tais plantas possuem, estavelmente
25 incorporadas em seu genoma, uma molécula de ácido nucléico

compreendendo uma sequência de nucleotídeos ARGOS da invenção operacionalmente ligada a um promotor que dirige a expressão na célula vegetal.

5 *iv. Modulando o Desenvolvimento de Raiz*

Métodos para modular o desenvolvimento de raiz em uma planta são providos. Por "modular o desenvolvimento de raiz" pretende-se qualquer alteração no desenvolvimento da
10 raiz da planta quando comparado a uma planta controle. Tais alterações no desenvolvimento da raiz incluem, mas não são limitadas a, alterações na taxa de crescimento da raiz primária, o peso fresco da raiz, a extensão de formação de raízes laterais e adventícias, o sistema vascular,
15 desenvolvimento de meristema, ou expansão radial.

Métodos para modular o desenvolvimento de raiz em uma planta são providos. Os métodos compreendem modular o nível e/ou atividade do polipeptídeo ARGOS na planta. Em
20 um método, uma sequência ARGOS da invenção é provida para a planta. Em outro método, a sequência de nucleotídeos ARGOS é provida introduzindo na planta um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos ARGOS da invenção, expressando a sequência ARGOS e, portanto,
25 modificando o desenvolvimento de raiz. Ainda em outros

métodos, a construção de nucleotídeo ARGOS introduzida na planta é estavelmente incorporada no genoma da planta.

Em outros métodos, o desenvolvimento de raiz é
5 modulado alterando-se o nível ou atividade do polipeptídeo ARGOS na planta. Um aumento em atividade de ARGOS pode resultar em pelo menos um ou mais das seguintes alterações para desenvolvimento de raiz, incluindo, mas não se limitando a, meristemas radiculares maiores, aumentado em
10 crescimento de raiz, expansão radial intensificada, um sistema vascular intensificado, ramificação de raiz aumentada, mais raízes adventícias, e/ou um aumento no peso fresco de raiz quando comparado a uma planta controle.

15 Como aqui usado, "crescimento de raiz" engloba todos os aspectos de crescimento das diferentes partes que perfazem o sistema radicular em diferentes estágios de seu desenvolvimento, tanto em plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. Deve ser entendido que crescimento de raiz
20 intensificado pode resultar de crescimento intensificado de uma ou mais de suas partes, incluindo a raiz primária, raízes laterais, raízes adventícias, etc.

Métodos de medir tais alterações de desenvolvimento no
25 sistema radicular são conhecidos na técnica. Ver, por

exemplo, U.S. Application No. 2003/0074698 e Werner, et al., (2001) PNAS 18:10487-10492, ambas são aqui incorporadas por referência.

5 Como discutido acima, um especialista reconhecerá o promotor apropriado para uso para modular o desenvolvimento de raiz na planta. Promotores exemplares para este avanço incluem promotores constitutivos e promotores preferidos de raiz. Promotores exemplares preferidos de raiz foram aqui
10 descritos em outra parte.

Estimular o crescimento de raiz e aumentar a massa de raiz elevando-se a atividade e/ou nível do polipeptídeo ARGOS também é útil para melhorar a capacidade de
15 sustentação de uma planta. O termo "resistência a corte" ou "capacidade de sustentação" refere-se à habilidade de uma planta para se fixar ao solo. Para plantas com um hábito ereto ou semi-ereto, este termo também refere-se à habilidade de manter uma posição vertical sob condições
20 (ambientais) adversas. Este traço está relacionado ao tamanho, profundidade, e morfologia do sistema radicular. Além disso, estimular o crescimento de raiz e aumentar a massa de raiz elevando-se o nível e/ou atividade do polipeptídeo ARGOS também é útil para promover a propagação
25 *in vitro* de explantes.

Adicionalmente, uma maior produção de biomassa de raiz devido a um nível e/ou atividade de atividade ARGOS elevado possui um efeito direto no rendimento e um efeito indireto de produção de compostos produzidos por células radiculares ou células radiculares transgênicas ou culturas de células de ditas células radiculares transgênicas. Um exemplo de um composto interessante produzido em culturas de raízes em chiconina, o rendimento do qual pode vantajosamente intensificado por ditos métodos.

Dessa maneira, a presente invenção provê ainda plantas tendo desenvolvimento de raiz modulado quando comparada ao desenvolvimento de raiz de uma planta controle. Em alguns avanços, a planta da invenção possui um nível/atividade aumentado do polipeptídeo ARGOS da invenção e possui crescimento de raiz e/ou biomassa de raiz intensificado. Em outros avanços, tais plantas têm estavelmente incorporado em seu genoma uma molécula de ácido nucléico compreendendo uma sequência de nucleotídeos ARGOS da invenção operacionalmente ligada a um promotor que dirige a expressão na célula vegetal.

v. *Modulando o Desenvolvimento de Broto e de
Folha*

Métodos são também providos para modular o
5 desenvolvimento de broto e folha em uma planta. Por
"modular o desenvolvimento de broto e/ou folha" pretende-se
qualquer alteração no desenvolvimento do broto e/ou folha
da planta. Tais alterações no desenvolvimento de broto
e/ou folha incluem, mas não são limitadas a, alterações no
10 desenvolvimento de meristema de broto, no número de folhas,
tamanho de folha, vasos de folha e caule, comprimento de
internodo, e senescência foliar. Como aqui usado,
"desenvolvimento de folha" e "desenvolvimento de broto"
engloba todos os aspectos de crescimento das diferentes
15 partes que perfazem o sistema foliar e o sistema de broto,
respectivamente, em diferentes estágios de seu
desenvolvimento, tanto em plantas monocotiledôneas e
dicotiledôneas. Métodos para medir tais alterações no
desenvolvimento no sistema foliar e de broto são conhecidos
20 na técnica. Ver, por exemplo, Werner, et al., (2001) PNAS
98:10487-10492 e U.S. Application No. 2003/0074698, cada
qual é aqui incorporada por referência.

O método para modular o desenvolvimento de broto e/ou
25 folha em uma planta compreende modular a atividade e/ou

nível de um polipeptídeo ARGOS da invenção. Em um avanço, uma sequência ARGOS da invenção é provida. Em outros avanços, a sequência de nucleotídeos ARGOS pode ser provida introduzindo-se na planta um polinucleotídeo compreendendo
5 uma sequência de nucleotídeos ARGOS da invenção, expressando a sequência ARGOS e, dessa forma, modificando o desenvolvimento de broto e/ou folha. Em outros avanços, a construção de nucleotídeos ARGOS introduzido na planta é estavelmente incorporada no genoma da planta.

10

Em avanços específicos, o desenvolvimento de broto ou folha é modulado diminuindo-se o nível e/ou atividade do polipeptídeo ARGOS na planta. Uma diminuição na atividade de ARGOS pode resultar em pelo menos uma ou mais das
15 seguintes alterações no desenvolvimento de broto e/ou folha, incluindo, mas não se limitando a, número de folha reduzido, superfície foliar reduzida, vascular reduzido, internodos mais curtos e crescimento abalado, e senescência foliar retardada, quando comparado a uma planta controle.

20

Como discutido acima, um especialista reconhecerá o promotor apropriado para uso para modular o desenvolvimento de broto e folha da planta. Promotores exemplares para este avanço incluem promotores constitutivos, promotores
25 preferenciais de broto, promotores preferenciais de

meristema de broto, e promotores preferenciais de folha. Promotores exemplares foram aqui descritos em outra parte.

Diminuir a atividade e/ou nível de ARGOS em uma planta
5 resulta em internodos mais curtos e crescimento abalado. Assim, os métodos da invenção são úteis para produzir plantas anãs. Além disso, como discutido acima, a modulação de atividade de ARGOS na planta modula tanto o crescimento de raiz como de broto. Assim, a presente
10 invenção prove, ainda, métodos para alterar a razão raiz/broto. O desenvolvimento de broto ou folha pode ser ainda modulado diminuindo-se o nível e/ou atividade do polipeptídeo ARGOS na planta.

15 Dessa maneira, a presente invenção provê ainda plantas tendo desenvolvimento de broto e/ou folha modulado quando comparado a uma planta controle. Em alguns avanços, a planta da invenção possui um nível/atividade do polipeptídeo ARGOS da invenção aumentado, alterando o
20 desenvolvimento de broto e/ou folha. Tais alterações incluem, mas não são limitadas a, número de folhas aumentado, superfície foliar aumentada, vascularidade aumentada, internodos mais longos e estatura de planta aumentada, assim como alterações em senescência foliar, se
25 comparado a uma planta controle. Em outros avanços, a

planta da invenção possui um nível/atividade do polipeptídeo ARGOS da invenção diminuído.

vi *Modulando o Desenvolvimento de Tecido*

5

Reprodutivo

Métodos para modular o desenvolvimento de tecido reprodutivo são providos. Em um avanço, são providos métodos para modular o desenvolvimento floral em uma
10 planta. Por "modular o desenvolvimento floral" pretende-se qualquer alteração em uma estrutura de um tecido reprodutivo de planta se comparado a uma planta controle na qual a atividade ou nível do polipeptídeo ARGOS não foi modulada. "Modular o desenvolvimento floral" inclui ainda
15 qualquer alteração no sincronismo do desenvolvimento de um tecido reprodutivo de planta (i.e., um sincronismo atrasado ou acelerado de desenvolvimento floral) quando comparado a uma planta controle na qual a atividade ou nível do polipeptídeo ARGOS não foi modulada. Alterações
20 macroscópicas podem incluir mudanças em tamanho, formato, número, ou localização ou órgãos reprodutivos, o período de tempo de desenvolvimento com que essas estruturas se formam, ou a habilidade de manter ou proceder através do processo de florada em tempos de estresse ambientais.
25 Alterações microscópicas podem incluir mudanças aos tipos

ou formatos de células que perfazem os órgãos reprodutivos.

O método para modular o desenvolvimento floral em uma planta compreende modular a atividade de ARGOS em uma
5 planta. Em um método, uma sequência ARGOS da invenção é provida. Uma sequência de nucleotídeos ARGOS pode ser provida introduzindo-se na planta um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos ARGOS da invenção, expressando a sequência ARGOS, e, dessa forma,
10 modificando o desenvolvimento floral. Em outros avanços, a construção de nucleotídeos ARGOS introduzido na planta é estavelmente incorporada no genoma da planta.

Em métodos específicos, o desenvolvimento floral é
15 modulado diminuindo-se o nível ou atividade do polipeptídeo ARGOS na planta. Um decréscimo na atividade de ARGOS pode resultar em pelo menos uma ou mais das seguintes alterações em desenvolvimento floral, incluindo, mas não se limitando a, florada retardada, número de flores reduzido,
20 esterilidade masculina parcial, e postura de sementes reduzida, quando comparado a uma planta controle. Induzir florada atrasada ou inibir a florada pode ser usado para intensificar o rendimento em cultivos de forrageio, tais como alfafa. Métodos para medir tais alterações de
25 desenvolvimento em desenvolvimento floral são conhecidos na

técnica. Ver, por exemplo, Mouradov, et al., (2002) *The Plant Cell* S111-S130, aqui incorporada por referência.

Como discutido acima, um especialista reconhecerá o
5 promotor apropriado para uso para modular o desenvolvimento
floral da planta. Promotores exemplares para este avanço
incluem promotores constitutivos, promotores induzidos,
promotores preferenciais de brotos, e promotores
preferenciais de inflorescência.

10

Em outros métodos, o desenvolvimento floral é modulado
aumentando-se o nível e/ou atividade da sequência ARGOS da
invenção. Tais métodos podem compreender introduzir uma
sequência de nucleotídeos ARGOS na planta e aumentar a
15 atividade do polipeptídeo ARGOS. Em outros métodos, a
construção de nucleotídeos ARGOS introduzida na planta é
estavelmente incorporada no genoma da planta. Aumentar a
expressão da sequência ARGOS da invenção pode modular o
desenvolvimento floral durante períodos de estresse. Tais
20 métodos são aqui descritos em outra parte. Dessa maneira,
a presente invenção provê ainda plantas tendo
desenvolvimento floral modulado quando comparado ao
desenvolvimento floral de uma planta controle. Composições
incluem plantas tendo um nível/atividade do polipeptídeo
25 ARGOS da invenção aumentado e tendo um desenvolvimento

floral alterado. Composições também incluem plantas tendo um nível/atividade do polipeptídeo ARGOS da invenção aumentado caracterizado pelo fato de que a planta mantém ou procede o processo de florada em tempos de estresse.

5

Métodos são também providos para o uso das seqüências ARGOS da invenção para aumentar o tamanho e/ou peso de semente. O método compreende aumentar a atividade das seqüências ARGOS em uma planta ou parte de planta, tal como a semente. Um aumento em tamanho e/ou peso de semente compreende um tamanho ou peso aumentado da semente e/ou um aumento no tamanho ou peso de uma ou mais partes da semente incluindo, por exemplo, o embrião, endosperma, cobertura da semente, aleurona, ou cotilédone.

15

Como discutido acima, um especialista reconhecerá o promotor apropriado para uso para aumentar o tamanho de semente e/ou peso de semente. Promotores exemplares deste avanço incluem promotores constitutivos, promotores induzidos, promotores preferenciais de semente, promotores preferenciais de embrião, e promotores preferenciais de endosperma.

O método para diminuir o tamanho de semente e/ou peso de semente em uma planta compreende diminuir a atividade de

ARGOS na planta. Em um avanço, a sequência de nucleotídeos ARGOS pode ser provida pela introdução na planta um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de nucleotídeos ARGOS da invenção, expressando a sequência ARGOS, e, dessa
5 forma, diminuindo o peso e/ou tamanho de semente. Em outros avanços, a construção de nucleotídeos ARGOS introduzida na planta é estavelmente incorporada no genoma da planta.

10 É ainda reconhecido que aumentar o tamanho e/ou peso de semente pode estar também acompanhado por um aumento na velocidade de crescimento de plântulas ou um aumento em vigor inicial. Como aqui usado, o termo "vigor inicial" refere-se à habilidade de uma planta crescer rapidamente
15 durante o desenvolvimento inicial, e está relacionado ao estabelecimento bem-sucedido, após a germinação, de um sistema radicular bem desenvolvido e um aparato fotossintético bem desenvolvido. Além disso, um aumento em tamanho e/ou peso de semente pode resultar, também, em um
20 aumento no rendimento vegetal quando comparado a um controle.

Dessa maneira, a presente invenção provê ainda plantas tendo um peso de semente e/ou tamanho de semente aumentado
25 quando comparado a uma planta controle. Em outros avanços,

plantas tendo vigor e rendimento vegetal aumentados são também providas. Em alguns avanços, a planta da invenção possui um nível/atividade do polipeptídeo ARGOS da invenção aumentado e possui um peso de semente e/ou tamanho de semente aumentado. Em outros avanços, tais plantas têm estavelmente incorporado em seu genoma uma molécula de ácido nucléico compreendendo uma sequência de nucleotídeos ARGOS da invenção operacionalmente ligada a um promotor que dirige a expressão na célula vegetal.

10

*viii. Método de Uso para polinucleotídeos
promotores de ARGOS*

Os polinucleotídeos compreendendo os promotores de ARGOS descritos na presente invenção, assim como variantes e fragmentos desses, são úteis na manipulação genética de qualquer célula hospedeira, preferencialmente célula vegetal, quando reunidos com uma construção de DNA, de forma que a sequência promotora seja operacionalmente ligada a uma sequência de nucleotídeos compreendendo um polinucleotídeo de interesse. Dessa maneira, os polinucleotídeos promotores de ARGOS da invenção são providos em cassetes de expressão juntos com uma sequência de polinucleotídeos de interesse para expressão na célula hospedeira de interesse. Como discutido no Exemplo 2

abaixo, as seqüências promotoras de ARGOS da invenção são expressas em uma variedade de tecidos e, assim, as seqüências promotoras são úteis em regular a expressão temporal e/ou espacial de polinucleotídeos de interesse.

5

Regiões promotoras híbridas sintéticas são conhecidas na técnica. Tais regiões compreendem elementos promotores acima de um polinucleotídeo operacionalmente ligado ao elemento promotor de outro polinucleotídeo. Em um avanço da invenção, a expressão de seqüência heteróloga é controlada por um promotor híbrido sintético compreendendo as seqüências promotoras de ARGOS da invenção, ou um variante ou fragmento dessa, operacionalmente ligadas a elemento(s) promotor(es) acima, a partir de um promotor heterólogo. Elementos promotores acima que estão envolvidos no sistema de defesa da planta foram identificados e podem ser usados para gerar um promotor sintético. Ver, por exemplo, Rushton, *et al.*, (1998) *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:311-315. Alternativamente, uma seqüência promotora de ARGOS sintética pode compreender duplicações dos elementos promotores acima encontrados nas seqüências promotoras de ARGOS.

É reconhecido que a seqüência promotora da invenção pode ser usada com suas seqüências codificadoras de ARGOS

nativa. Uma construção de DNA compreendendo o promotor de ARGOS operacionalmente ligado com seu gene de ARGOS nativo pode ser usada para transformar qualquer planta de interesse para perfazer uma mudança fenotípica desejada, tal como modular o número de células, modular o desenvolvimento de raiz, broto, folha, flores, e embrião, tolerância a estresse, e qualquer outro fenótipo aqui descrito em outra parte.

10 As seqüências promotoras de nucleotídeos e métodos aqui descritos são úteis para regular a expressão de qualquer seqüência heteróloga de nucleotídeos em uma planta hospedeira para variar o fenótipo de uma planta. Várias mudanças em fenótipo são de interesse incluindo modificar a
15 composição de ácidos graxos em uma planta, alterar o conteúdo de aminoácido de uma planta, alterar um mecanismo de defesa contra patógenos de uma planta, e similares. Esses resultados podem ser alcançados provendo a expressão de produtos heterólogos ou expressão aumentada de produtos
20 endógenos em plantas. Alternativamente, os resultados podem ser alcançados provendo uma redução de expressão de um ou mais produtos endógenos, particularmente enzimas ou co-fatores na planta. Essas mudanças resultam em uma mudança em fenótipo da planta transformada.

Genes de interesse são um reflexo dos mercados comerciais e interesses daqueles envolvidos no desenvolvimento do cultivo. Cultivos e mercados de interesse mudam, e à medida que as nações em desenvolvimento abrem mercados mundiais, novos cultivos e tecnologias irão também emergir. Além disso, como nosso entendimento de traços agronômicos e características, tais como aumento do rendimento e heterose, a escolha de genes para transformação irá se modificar dessa maneira.

10 Categorias gerais de genes de interesse incluem, por exemplo, aqueles genes envolvidos em informação, tais como genes de zinco, aqueles envolvidos em comunicação, tais como quinases, e aqueles envolvidos em manutenção, tais como proteínas de choque de calor. Mais categorias

15 específicas de transgenes, por exemplo, incluem genes codificando importantes traços para agronomia, resistência a insetos, resistência a doenças, resistência a herbicidas, esterilidade, características de grão, produtos e comerciais. Genes de interesse incluem, geralmente,

20 aqueles envolvidos no metabolismo de óleo, amido, carboidrato, ou nutrientes assim como aqueles afetando o tamanho de grão, carregamento de sacarose, e similares.

Em certos avanços, as seqüências de ácidos nucleicos

25 da presente invenção podem ser usadas em combinação

("combinadas") com outras seqüências de polinucleotídeos de interesse para criar plantas com um fenótipo desejado. As combinações geradas podem incluir múltiplas cópias de qualquer um ou mais dos polinucleotídeos de interesse. Os

5 polinucleotídeos da presente invenção podem ser combinados com qualquer gene ou combinação de genes para produzir plantas com uma variedade de combinações de traços desejados, incluindo, mas não se limitando a, traços desejáveis para alimentação, tais como genes de alto nível

10 de óleos (e.g., U.S. Patent No. 6.232.529); aminoácidos balanceados (e.g., hordotioninas (U.S. Patent Nos. 5.990.389; 5.885.801; 5.885.802; e 5.703.409); alto teor de lisina em cevada (Williamson, et al., (1987) *Eur. J. Biochem.* 165:99-106; e WO 98/20122); e proteínas com muita

15 metionina (Pedersen, et al., (1986) *J. Biol. Chem.* 261:6279; Kirihara, et al., (1988) *Gene* 71:359; e Musumura, et al., (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:123)); digestibilidade aumentada (e.g., proteínas de armazenamento modificadas (U.S. Application Serial No. 10/053.410, preenchida em 7 de

20 novembro de 2001); e tioredoxinas (U.S. Application Serial No. 10/005.429, preenchida em 3 de dezembro 2001)), as descrições das quais são aqui incorporadas por referência. Os polinucleotídeos da presente invenção podem ser também combinados com traços desejáveis para resistência a

25 insetos, doenças ou herbicidas (e.g., proteínas tóxicas de

Bacillus thuringiensis (U.S. Patent Nos. 5.366.892; 5.747.450; 5.737.514; 5.723.756; 5.593.881; Geiser, et al., (1986) *Gene* 48:109); lectinas (Van Damme, et al., (1994) *Plant Mol. Biol.* 24:825); genes de desintoxicação de fumonisina (U.S. Patent No. 5.792.931); genes de avirulência e resistência a doenças (Jones, et al., (1994) *Science* 266:789; Martin, et al., (1993) *Science* 262:1432; Mindrinos, et al., (1994) *Cell* 78:1089); mutantes de acetolactato sintase (ALS) que levam a resistência a herbicidas, tais como as mutações S4 e/ou Hra; inibidores de sintase glutamina, tais como fosfinotricina ou basta (e.g., gene *bar*); e resistência a glifosato (gene EPSPS)); e traços desejáveis para processar ou produtos de processo, tais como alto conteúdo de óleo (e.g., U.S. Patent No. 6.232.529); óleos modificados (e.g., genes de desaturase de ácidos graxos (U.S. Patent No. 5.952.544; WO 94/11516)); amidos modificados (e.g., ADPG pirofosforilases (AGPase), amidos modificados (SS), enzimas de ramificação de amido (SBE) e enzimas de desramificação de amido (SDBE)); e polímeros ou bioplásticos (e.g., U.S. patent No. 5.602.321; beta-cetotiolase, polihidroxitirato sintase, e acetoacetil-CoA redutase (Schubert, et al., (1988) *J. Bacteriol.* 170:5837-5847) facilitar a expressão de polihidroxicanoatos (PHAs)), as descrições das quais são aqui incorporadas por referência. Pode-se também combinar

os polinucleotídeos da presente invenção com polinucleotídeos afetando características agronômicas, tais como esterilidade masculina (e.g., ver U.S. Patent No. 5.583.210), força de caule, tempo de florada, ou traços de tecnologia de transformação, como regulação de ciclo celular ou direcionamento de genes (e.g., WO 99/61619; WO 00/17364; WO 99/25821), as descrições das quais são aqui incorporadas por referência.

10 Em um avanço, seqüências de interesse melhoram o crescimento vegetal e/ou rendimentos de cultivo. Por exemplo, seqüências de interesse incluem genes agronomicamente importantes que resultam em sistemas radiculares primários ou laterais melhorados. Tais genes
15 incluem, mas não estão limitados a, transportadores de nutrientes/água e indutores de crescimento. Exemplos de tais genes, incluem, mas não são limitados a, H^+ -ATPase de membrana plasmática de milho (MHA2) (Frias, et al., (1996) *Plant Cell* 8:1533-44); AKT1, um componente do aparato de
20 absorção de potássio em *Arabidopsis*, (Spalding, et al., (1999) *J Gen Physiol* 113:909-18); genes RML que ativam o ciclo de divisão celular nas células radiculares apicais (Cheng, et al., (1995) *Plant Physiol* 108:881); genes glutamina sintetase de milho (Sukanya, et al., (1994) *Plant*
25 *Mol Biol* 26:1935-46) e hemoglobina (Duff, et al., (1997) *J.*

Biol. Chem 27:16749-16752, Arredondo-Peter, et al., (1997)
Plant Physiol. 115:1259-1266; Arredondo-Peter, et al.,
(1997) *Plant Physiol* 114:493-500 e referências aí citadas).

A sequência de interesse pode ser útil, também, para
5 expressar seqüências de nucleotídeos anti-senso de genes
que afetam negativamente o desenvolvimento de raiz.

Traços adicionais importantes agronomicamente, tais
como conteúdo de óleo, amido e proteína podem ser
10 geneticamente alterados além de se usar métodos de
melhoramento tradicionais. Modificações incluem aumentar o
conteúdo de ácido oléico, óleos saturados insaturados,
aumentar os níveis de lisina e enxofre, fornecer
aminoácidos essenciais, e também modificação de amido.
15 Modificações em proteína hordotionina são descritas em U.S.
Patent Nos. 5.703.049, 5.885.801, 5.885.802, e 5.990.389,
aqui incorporada por referência. Outro exemplo é proteína
de semente rica em lisina e/ou enxofre codificada pela
albumina 2S de soja descrita em U.S. Patent No. 5.850.016,
20 e o inibidor de quimotripsina de cevada, descrito em
Williamson, et al., (1987) *Eur. J. Biochem.* 165:99-106, as
descrições das quais são aqui incorporadas por referência.

Derivados das seqüências codificadoras podem ser
25 feitos por mutagênese sítio direcionada para aumentar o

nível de aminoácidos pré-selecionados no polipeptídeo codificado. Por exemplo, o gene codificando o polipeptídeo de alto conteúdo de lisina em cevada (BHL) é derivado do inibidor de quimotripsina de cevada, U.S. Application
5 Serial No. 08/740.682, preenchida em 1º de novembro de 1996, e WO 98/20133, as descrições das quais são aqui incorporadas por referência. Outras proteínas incluem proteínas vegetais ricas em metionina, tais como de sementes de girassol (Lilley, et al., (1989) *Proceedings of*
10 *the World Congress on Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feedstuffs*, ed. Applewhite (American Oil Chemists Society, Champaign, Illinois), pp. 497-502; aqui incorporada por referência); milho (Pedersen, et al., (1986) *J. Biol. Chem.* 261:6279; Kirihara, et al., (1988)
15 *Gene* 71:359; ambas as quais são aqui incorporadas por referência); e arroz (Musumura, et al., (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:123, aqui incorporada por referência). Outros genes agronomicamente importantes codificam látex, *Floury* 2, fatores de crescimento, fatores de armazenamento de
20 sementes, e fatores de transcrição.

Genes de resistência a insetos podem codificar resistência a pestes que causam uma grande retirada de rendimento, tais como larva-da-raiz, larva de besouro
25 noctuídeo, lagarta européia, e similares. Tais genes

incluem, por exemplo, genes de proteína tóxica de *Bacillus thuringiensis* (U.S. Patent Nos. 5.366.892; 5.747.450; 5.736.514; 5.723.756; 5.593.881; e Geiser, et al., (1986) *Gene* 48:109); e similares.

5

Genes codificando traços de resistência a doenças incluem genes de desintoxicação, tais como contra fumonosina (U.S. Patent No. 5.792.931); genes avirulência (avr) e resistência à doença (R) (Jones, et al., (1994) *Science* 266:789; Martin, et al., (1993) *Science* 262:1432; e Mindrinos, et al., (1994) *Cell* 78:1089); e similares.

Traços de resistência a herbicida podem incluir genes codificando resistência a herbicidas que atuam para inibir a ação de acetolactato sintase (ALS), em particular os herbicidas tipo sulfoniluréia (e.g., o gene de acetolactato sintase (ALS) contendo mutações levando a tal resistência, em particular as mutações S4 e/ou Hra), genes codificando resistência a herbicidas que atuam para inibir a ação de glutamina sintase, tais como fosfinotricina ou basta (e.g., o gene *bar*), ou outros tais genes conhecidos na técnica. O gene *bar* codifica resistência ao herbicida basta, o gene *nptII* codifica resistência aos antibióticos canamicina e geneticina, e os mutantes do gene ALS codificam resistência ao herbicida clorsulfuron.

Genes de esterilidade podem ser também codificados em um cassete de expressão e provém uma alternativa para retirada de pendão física. Exemplos de genes usados em tais meios incluem genes preferenciais de tecido masculino e genes com fenótipos de esterilidade masculina, tais como QM, descrito em U.S. Patent No. 5.583.210. Outros genes incluem quinases e aqueles codificando compostos tóxicos tanto para o desenvolvimento de gametófito masculino como para feminino.

A qualidade de grão é refletida em traços, tais como níveis e tipos de óleos, saturado e insaturado, qualidade e quantidade de aminoácidos essenciais, e níveis de celulose. Em milho, proteínas hordotioninas modificadas são descritas em U.S. Patent Nos. 5.703.049, 5.885.801, 5.885.802, e 5.990.389.

Traços comerciais podem ser também codificados em um gene ou genes que poderiam aumentar, por exemplo, amido para a produção de etanol, ou prover a expressão de proteínas. Outro importante uso comercial de plantas transformadas é a produção de polímeros e bioplásticos, tais como descrito em U.S. Patent No. 5.602.321. Genes tais como β -cetotiolase, PHBase (polihidroxiburirato

sintase), e acetoacetil-CoA redutase (ver, Schubert, et al., (1988) *J. Bacteriol.* 170:5837-5847) facilitam a expressão de polihidroxicarboxilatos (PHAs).

5 Produtos exógenos incluem enzimas e produtos vegetais, assim como aqueles de outras fontes incluindo procariontes e outros eucariontes. Tais produtos incluem enzimas, co-fatores, hormônios e similares. O nível de proteínas, proteínas particularmente modificadas, tendo distribuição
10 de aminoácido melhorada para melhorar o valor nutricional da planta, pode ser aumentado. Isto é alcançado pela expressão de tais proteínas tendo conteúdo de aminoácido intensificado.

15 Esta invenção pode ser mais bem entendida por referência aos seguintes exemplos não limitantes. Será ponderado por aqueles especialistas na técnica que outros avanços da invenção podem ser praticados sem sair do espírito e do escopo da invenção, como aqui descrito e
20 reivindicado.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Isolamento de seqüências ARGOS

Uma rotina para identificar todos os membros de uma família de genes foi empregada para buscar genes ARGOS de interesse. Um grupo diverso de todos os membros conhecidos da família de genes, como seqüências de proteínas, foi
5 preparado. Esses dados incluem seqüências de outras espécies. Essas espécies são contrapostas contra uma base de dados de seqüências de milho e um grupo não redundante de pontos se sobrepondo é identificado. Separadamente, pega-se as seqüências de nucleotídeos de qualquer gene de
10 interesse em mãos e contrapõe-se contra a base de dados e um grupo não redundante de todos os pontos se sobrepondo é encontrado. O grupo de pontos de proteína é, então, comparado em relação aos pontos de nucleotídeo. Se a família de genes está completa, todos os pontos de proteína
15 estão contidos nos pontos de nucleotídeos. A família de genes ARGOS consiste de 3 genes de *Arabidopsis*, 8 genes de arroz, 9 genes de milho, 9 genes de sorgo, e 5 genes de soja. Uma representação em dendrograma das inter-relações das proteínas codificadas por esses genes é provida como a
20 Figura 1.

Exemplo 2. Análise de Seqüência ARGOS

Os polipeptídeos ZmARGOS da invenção atual possuem
25 características comuns com genes ARGOS em uma variedade de

espécies vegetais. A relação entre os genes das múltiplas espécies vegetais é mostrada em um alinhamento, ver Figuras 2. A figura 3 contém ZmARGOS 1, 2, 3, e AtARGOS 1 (SEQ ID NOS: 2, 4, 6 e 26). As proteínas codificadas pelos genes ARGOS possuem uma região rica em prolina bem conservada próxima do C-terminal. As regiões N-terminal são mais divergentes. As proteínas são relativamente curtas, em média 110 aminoácidos.

10 **Exemplo 3. Transformação e Regeneração de Plantas transgênicas**

Embriões imaturos de milho de plantas de estufa doadoras são bombardeados com um plasmídeo contendo a sequência ZmARGOS operacionalmente ligada ao promotor induzido por seca, promotor RAB17 (Vilardell, et al., (1990) *Plant Mol Biol* 14:423-432) e o gene marcador de seleção PAT, que confere resistência ao herbicida Bialaphos. Alternativamente, o gene marcador de seleção é provido em um plasmídeo separado. A transformação é efetuada como a seguir. As receitas de meio seguem abaixo.

Preparação de Tecido Alvo:

25 As espigas são descascadas e a superfície esterilizada

em 30% de alvejante Clorox mais 0,5% de Micro detergente por 20 minutos, e enxaguadas duas vezes com água estéril. Os embriões imaturos são excisados e colocados com o eixo do embrião virado para baixo (lado do escutelo para cima),
5 25 embriões por placa, em meio 560Y por 4 horas e, então, alinhados na zona alvo de 2,5cm em preparação para o bombardeamento.

Preparação de DNA:

10

Um vetor de plasmídeo compreendendo a sequência ARGOS operacionalmente ligada a um promotor de ubiquitina é feito. Esse DNA de plasmídeo mais DNA de plasmídeo contendo um marcador de seleção PAT são precipitados em
15 pelotas de tungstênio de 1,1 μ m (diâmetro médio) usando um procedimento de precipitação com CaCl_2 como se segue:

100 μ l preparado de partículas de tungstênio em água

10 μ l (1 μ g) de DNA em tampão Tris EDTA (1 μ g de DNA

20 total)

100 μ l CaCl_2 2,5 M

10 μ l espermidina 0,1 M

Cada reagente é adicionado sequencialmente à suspensão
25 de partículas de tungstênio, enquanto mantido no misturador

tipo vórtex multitubo. A mistura final é sonicada brevemente e deixada incubando sob agitação constante por 10 minutos. Após o período de precipitação, os tubos são centrifugados brevemente, o líquido removido, lavados com 5 500 ml de etanol 100%, e centrifugados por 30 segundos. Novamente, o líquido é removido, e 105 µl de etanol 100% são adicionados à pelota de partículas de tungstênio final. Para a pistola de bombardeamento de partículas, as partículas de tungstênio/DNA são sonicadas brevemente e 10 10 µl colocados no centro de cada macro-carregador e deixados secando por cerca de 2 minutos antes do bombardeamento.

Tratamento com Pistola de Partículas:

As placas de amostra são bombardeadas no nível #4 na 15 pistola de partículas #HE34-1 ou #HE34-2. Todas as amostras recebem um único tiro a 650 PSI, com um total de dez alíquotas retiradas de cada tubo de preparado partículas/DNA.

20 Tratamento Subseqüente:

Após o bombardeamento, os embriões são mantidos em meio 560Y por 2 dias, então transferidos para meio de seleção 560R contendo *Bialaphos* a 3 mg/litro, e sub- 25 cultivados a cada 2 semanas. Após aproximadamente 10

semanas de seleção, clones de calos resistentes a seleção são transferidos para meio 288J para iniciar a regeneração vegetal. Após o amadurecimento do embrião somático (2-4 semanas), embriões somáticos bem desenvolvidos são transferidos para meio para germinação e transferidos para a sala de cultura iluminada. Aproximadamente 7-10 dias depois, as plântulas em desenvolvimento são transferidas para meio 272V sem hormônio em tubos por 7-10 dias até que as plântulas estejam bem estabelecidas. As plantas são, então, transferidas para inserções em planos (equivalente a pote de 2,5") contendo solo de pote e crescidas por 1 semana em uma câmara de crescimento, crescidas subsequente por 1-2 semanas adicionais na estufa, então transferidas para potes clássicos 600 (1,6 galões) e cultivadas até a maturidade. As plantas são monitoradas e pontuadas para tolerância a seca aumentada. Testes para medir a tolerância a seca aumentada são rotina na técnica e incluem, por exemplo, rendimentos aumentados de capacidade de grãos por espiga sob condições de seca quando comparado a plantas de milho controle sob condições ambientais idênticas. Alternativamente, as plantas transformadas podem ser monitoradas para uma modulação em desenvolvimento de meristema (i.e., um decréscimo na formação de cravos na espiga). Ver, por exemplo, Bruce, et al., (2002) *Journal of Experimental Botany* 53:1-13.

Meios de Bombardeamento e Cultura:

Meio de bombardeamento (560Y) compreende 4,0 g/l de
5 sais basais N6 (SIGMA C-1416), 1,0 ml/l de mistura de
Vitamina Eriksson's (1000x SIGMA-1511), 0,5 mg/l de HCl
tiamina, 120,0 g/l de sacarose, 1,0 mg/l de 2,4-D, e 2,88
g/l de L-prolina (levado ao volume com H₂O dI seguindo o
ajuste para pH 5,8 com KOH); 2,0 g/l Gelrite™ (adicionado
10 após levar ao volume com H₂O dI); e 8,5 mg/l de nitrato de
prata (adicionados após esterilizar o meio e resfriar para
temperatura ambiente). Meio de seleção (560R) compreende
4,0 g/l de sais basais N6 (SIGMA C-1416), 1,0 ml/l de
mistura de vitamina Eriksson's (1000x SIGMA-1511), 0,5 mg/l
15 de HCl tiamina, 30,0 g/l de sacarose, e 2,0 mg/l de 2,4-D
(levados ao volume com H₂O dI seguindo o ajuste para pH 5,8
com KOH); 3,0 g/l de Gelrite™ (adicionado após levar ao
volume com H₂O dI); e 0,85 mg/l de nitrato de prata e 3,0
mg/l de Bialaphos (ambos adicionados após esterilizar o
20 meio e resfriar para temperatura ambiente).

Meio de regeneração vegetal (288J) compreende 4,3 g/l
de sais MS (GIBCO 11117-074), 5,0 ml/l de solução de
estoque de vitaminas MS (0,100 g de ácido nicotínico, 0,02
25 g/l de HCl tiamina, 0,10 g/l de HCl piridoxina, e 0,40 g/l

de glicina levados ao volume com H_2O dI polida) (Murashige and Skoog (1962) *Physiol. Plant.* 15:473), 100 mg/l de mio-inositol, 0,5 mg/l de zeatina, 60 g/l de sacarose, e 1,0 ml/l de 0,1 mM ácido abscísico (levados ao volume com H_2O dI polida após ajustar para pH 5,6); 3,0 g/l de Gelrite™ (adicionados após levar ao volume com H_2O dI); e 1,0 mg/l de ácido indoloacético e 3,0 mg/l de Bialaphos (adicionados após esterilizar o meio e resfriar para 60°C). Meio sem hormônios (272V) compreende 4,3 g/l de sais MS (GIBCO 11117-074), 5,0 ml/l de solução de estoque de vitaminas MS (0,100 g/l de ácido nicotínico, 0,02 g/l de HCl tiamina, 0,10 g/l de HCl piridoxina, e 0,40 g/l de glicina levados ao volume com H_2O dI polida), 0,1 g/l de mio-inositol, e 40,0 g/l de sacarose (levados ao volume com H_2O dI polida após ajustar o pH para 5,6); e 6 g/l de Bacto-ágar (adicionado após levar ao volume com H_2O dI polida), esterilizados e resfriados a 60° C.

Exemplo 5. Transformação por *Agrobacterium*

20

Para transformação de milho mediada por *Agrobacterium* com uma sequência anti-senso da sequência ZmARGOS da presente invenção, preferencialmente o método de Zhao é empregado (U.S. Patent No. 5.981.840, e a publicação PCT 25 WO98/32326; os conteúdos das quais são aqui incorporados por

referência). Resumidamente, embriões imaturos são isolados de milho e os embriões levados ao contato com uma suspensão de *Agrobacterium*, onde as bactérias são capazes de transferir a sequência ARGOS a pelo menos uma célula de
5 pelo menos um dos embriões imaturos (etapa 1: a etapa de infecção). Nesta etapa, os embriões imaturos são preferencialmente imersos em uma suspensão de *Agrobacterium* para a iniciação da inoculação. Os embriões são co-cultivados por um tempo com as *Agrobacterium* (etapa 2: a
10 etapa de co-cultivo). Preferencialmente, os embriões imaturos são cultivados em meio sólido após a etapa de infecção. Após este período de co-cultivo, uma etapa de "descanso" é contemplada. Nesta etapa de descanso, os embriões são incubados na presença de pelo menos um
15 antibiótico conhecido por inibir o crescimento de *Agrobacterium* sem a adição de um agente seletivo para transformantes vegetais (etapa 3: etapa de descanso). Preferencialmente, os embriões imaturos são cultivados em meio sólido com antibiótico, mas sem um agente de seleção,
20 para eliminação de *Agrobacterium* e por uma fase de descanso para as células infectadas. Em seguida, os embriões inoculados são cultivados em meio contendo um agente seletivo e os calos em crescimento transformados são recuperados (etapa 4: a etapa de seleção).
25 Preferencialmente, os embriões imaturos são cultivados em

meio sólido com um agente seletivo resultando no crescimento seletivo de células transformadas. O calo é, então, regenerado em plantas (etapa 5: a etapa de regeneração), e, preferencialmente os calos crescidos em meio seletivo são cultivados em meio sólido para regenerar as plantas. As plantas são monitoradas e pontuadas para uma modulação em desenvolvimento de meristema. Por exemplo, alterações de tamanho e aparência do broto e meristemas florais e/ou produção de folhas, flores e/ou frutos aumentada.

Exemplo 6. A super-expressão de ZmARGOS afeta o tamanho de planta e tamanho de órgão

A função do gene ZmARGOS foi testada usando-se plantas transgênicas expressando o transgene Ubi-ZmARGOS. A expressão de transgene foi confirmada usando-se primer RT-PCR específico de transgene (SEQ ID NO: 38 para ARGOS, e SEQ ID NO: 39 para PIN). Plantas T1 de nove eventos de cópias simples foram avaliadas no campo. As plantas transgênicas apresentaram intensificações positivas em crescimento em diversos aspectos.

Crescimento Vegetativo e acúmulo de biomassa:

Comparado aos aparentados não transgênicos, as plantas transgênicas (na geração T1) apresentaram uma média de aumento de 4% em altura de planta por todos os 9 eventos e até 12% no evento mais alto. O caule das plantas transgênicas era mais espesso do que aparentados não transgênicas, como medido por valores de diâmetro de caule, com uma média de 9% a 22% de aumento dentre os nove eventos. O aumento da altura de planta e a espessura resultaram em uma maior estatura de planta e biomassa para as plantas transgênicas. O acúmulo de biomassa estimada apresentou um aumento de 30% em média e até 57% em linhas transgênicas positivas, comparado aos aparentados negativos.

ZmARGOS foi visto por causar impacto no crescimento vegetal principalmente acelerando a taxa de crescimento, mas não estendendo o período de crescimento. O crescimento intensificado, i.e., tamanho de planta aumentado e acúmulo de biomassa, aparenta ser largamente devido à taxa de crescimento acelerada, e não a um período estendido de crescimento, pois as plantas transgênicas não atrasaram a florada, baseado nas datas de formação de seda e antese. De fato, as plantas transgênicas floresceram mais cedo do que os aparentados não transgênicos. Em média, pelos eventos, os dias para florada foram encurtados entre 30

unidades de calor (1-1,5 dias), e 69 unidades de calor (2-2,5 dias). Portanto, a super-expressão do gene ZmARGOS acelerou a taxa de crescimento da planta. A taxa de crescimento acelerada parece estar associada com uma taxa
5 de proliferação de célula elevada.

O crescimento vegetativo intensificado, acúmulo de biomassa em transgênicos e taxa de crescimento acelerada foram ainda testados com experimentos de campo extensivos,
10 tanto em híbridos como em bases inter cruzadas em geração avançada (T3). Plantas transgênicas reprodutivamente apresentaram altura de planta aumentada em até 18%, diâmetro de caule em até 10%, massa seca de pendão em até 15%, área foliar aumentada em até 14%, massa vegetal seca
15 total em até 25%. A florada mais cedo observada na geração T1 foi novamente observada na geração T3.

Crescimento reprodutivo e produção de grãos:

20 A super-expressão do gene ZmARGOS1 também intensificou o crescimento de órgão reprodutivo. Plantas transgênicas T1 apresentaram comprimento de espiga aumentado, cerca de 10% na média de nove eventos, e até 14% para o maior evento. O peso total de grão por espiga aumentou 13% em
25 média e até 70% para um evento. O aumento no peso total de

grãos parece ser atribuído ao número de grãos e tamanho de grão aumentados. A média dos nove eventos mostrou que o número de grãos por espiga aumentou 8%, e até 50% no maior evento. O peso de 100 grãos aumentou 5% em média e até 13% para o maior evento. A mudança positiva nas características de grão e espiga está associada com aumento em produção de grãos.

O crescimento reprodutivo intensificado e produção de grãos de transgênicos foram novamente confirmados em experimentos de campo extensivos na geração avançada (T3). A intensificação foi observada tanto em bases inter cruzadas como híbridas. Como comparado com aparentado transgênico como controle, as plantas transgênicas apresentaram um aumento significativo em massa seca primária de espiga em até 60%, massa seca secundária de espiga em até 4,7 vezes, massa seca de pendão em até 25%, e massa seca de casca em até 40%. Os transgênicos apresentaram até 13% de aumento em número de grãos por espiga, e até 13% de aumento em produção de grãos.

Plantas transgênicas também apresentaram ASI reduzido, até 40 unidades de calor, esterilidade reduzida em até 50%, e número reduzido de grãos abortados em até 64%. A redução é mais quando as plantas foram cultivadas em uma condição

de estresse de alta densidade de plantas. Uma medida reduzida desses parâmetros é freqüentemente relacionada à tolerância a estresse biótico.

5 Além disso, o nível de expressão de transgene está significativamente correlacionado com a massa seca de espiga.

Exemplo 7. Transformação de Embrião de Soja

10

Embriões de soja são bombardeados com um plasmídeo contendo uma seqüência ARGOS operacionalmente ligada a um promotor de ubiquitina como se segue. Para induzir embriões somáticos, cotilédones de 3-5 mm em comprimento
15 dissecados a partir de sementes imaturas com superfície esterilizada do cultivar de soja A2872, são cultivados na luz ou no escuro a 26°C em meio de ágar apropriado por seis a dez semanas. Embriões somáticos produzindo embriões secundários são, então, excisados e colocados em um meio
20 líquido adequado. Após seleção repetida para agrupamentos de embriões somáticos que se multiplicaram como embriões iniciais de estágio globular, as suspensões são mantidas como descrito abaixo.

Culturas em suspensão embriogênicas de soja podem ser mantidas em 35 ml de meio líquido em um agitador de rotação, 150 rpm, a 26°C com luzes frias brancas fluorescentes em fotoperíodo de 16:8 hr dia/noite. As
5 culturas são subcultivadas a cada duas semanas inoculando-se aproximadamente 35 mg de tecido em 35 ml de meio líquido.

Culturas em suspensão embriogênicas de soja podem ser,
10 então, transformadas pelo método de bombardeamento por pistola de partículas (Klein, et al., (1987) *Nature* (London) 327:70-73, U.S. Patent No. 4.945.050). Um instrumento Du Pont Biolistic PDS1000/HE (de retroalimentação de hélio) pode ser usado para essas
15 transformações.

Um gene marcador de seleção que pode ser usado para facilitar a transformação de soja é um transgene composto do promotor 35S de Vírus de Mosaico de Couve-Flor (Odell,
20 et al., (1985) *Nature* 313:810-812), o gene de higromicina fosfotransferase de plasmídeo pJR225 (de *E. coli*; Gritz, et al., (1983) *Gene* 25:179-188), e a região 3' do gene de nopalina sintase do T-DNA do plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. O cassete de expressão compreendendo uma
25 sequência ARGOS senso operacionalmente ligada ao promotor

de ubiquitina pode ser isolada como fragmento de restrição. Esse fragmento pode ser, então, inserido em um sítio de restrição em particular do vetor carregando o gene marcador.

5

Para 50 μ l de uma suspensão de partículas de ouro de 1 μ m a 60 mg/ml é adicionado (em ordem): 5 μ l DNA (1 μ g/ μ l), 20 μ l espermidina (0,1 M), e 50 μ l CaCl_2 (2,5 M). A preparação de partículas é, então, agitada por três 10 minutos, girada em um *microfuge* por 10 segundos e o sobrenadante removido. As partículas cobertas por DNA são, então, lavadas uma vez em 400 μ l de etanol 70% e ressuspensas em 40 μ l de etanol anidro. A suspensão DNA/partículas pode ser sonicada três vezes por um segundo 15 cada. Cinco microlitros das partículas de ouro cobertas por DNA são, então, carregados em um disco macrocarregador.

Aproximadamente 300-400 mg de uma cultura de suspensão de duas semanas de idade são colocados em uma placa de 20 petri vazia de 60x15 mm e o líquido residual removido do tecido com uma pipeta. Para cada experimento de transformação, aproximadamente 5-10 placas de tecido são normalmente bombardeadas. A pressão de ruptura de membrana é ajustada a 1100 psi, e a câmara evacuada a um vácuo de 28 25 polegadas de mercúrio. O tecido é colocado a

aproximadamente 3,5 polegadas da tela de retenção e bombardeado três vezes. Após o bombardeamento, o tecido pode ser dividido ao meio e colocado de volta em líquido e cultivado como descrito acima.

5 De cinco a sete dias após o bombardeamento, o meio líquido pode ser trocado por meio fresco, e de onze a doze dias após o bombardeamento por meio fresco contendo higromicina a 50 mg/ml. Esse meio seletivo pode ser refrescado semanalmente. De sete a oito semanas após o
10 bombardeamento tecido verde transformado pode ser observado crescendo a partir de agrupamentos embriogênicos necróticos não transformados. Tecido verde isolado é removido e inoculado em frascos individuais para gerar novas culturas em suspensão embriogênicas transformadas, propagadas
15 clonalmente. Cada nova linha pode ser tratada como um evento de transformação independente. Essas suspensões podem ser, então, subcultivadas e mantidas como agrupamentos de embriões imaturos ou regeneradas em plantas inteiras por maturação e germinação de embriões somáticos
20 individuais.

Exemplo 8. Transformação de Tecido Meristemático de Girassol

Tecidos meristemáticos de girassol são transformados com um cassete de expressão contendo uma sequência ARGOS operacionalmente ligada a um promotor de ubiquitina como se segue (ver também, European Patent Number EP 0 486233, aqui incorporada por referência, e Malone-Schoneberg, et al., (1994) *Plant Science* 103:199-207). Sementes de girassol maduras (*Helianthus annuus* L.) são descascadas usando uma debulhadora de cabeça de trigo simples. Sementes têm suas superfícies esterilizadas por 30 minutos em uma solução alvejante de Clorox 20% com a adição de duas gotas de Tween 20 por 50 ml de solução. As sementes são enxaguadas duas vezes com água destilada estéril.

Explantes de eixo embriogênico dividido são preparados por uma modificação de procedimentos descrita por Schrammeijer, et al., (Schrammeijer, et al., (1990) *Plant Cell Rep.* 9:55-60). Sementes são embebidas em água destilada por 60 minutos após o procedimento de esterilização da superfície. Os cotilédones de cada semente são, então, quebrados, produzindo uma fratura limpa no plano do eixo embriogênico. Após a excisão da ponta da raiz, os explantes são bisseccionados longitudinalmente entre as folhas primordiais. As duas metades são colocadas, cortadas com a superfície para cima, em meio GBA consistindo de Murashige and Skoog elementos minerais

(Murashige, et al., (1962) *Physiol. Plant.*, 15:473-497),
adições de vitamina de Shepard (Shepard (1980) *Emergent
Techniques for the Genetic Improvement of Crops* University
of Minnesota Press, St. Paul, Minnesota), adenina sulfato
5 40 mg/l, sacarose 30 g/l, 6-benzil-aminopurina (BAP) 0,5
mg/l, ácido indolo-3-acético (IAA) 0,25 mg/l, ácido
giberélico (GA₃), pH 5,6, e Phytagar 8 g/l.

Os explantes são sujeitos a bombardeamento por
10 microprojéteis antes do tratamento com *Agrobacterium*
(Bidney, et al., (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:301-313). De
trinta a quarenta explantes são colocados em um círculo no
centro de uma placa de 60 X 20 mm para este tratamento.
Aproximadamente 4,7 mg de microprojéteis de tungstênio de
15 1,8 mm são ressuspensos em 25 ml de tampão TE estéril (10
mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e alíquotas de 1,5 ml são
usadas por bombardeamento. Cada placa é bombardeada duas
vezes através de uma tela nytex de 150 mm posicionada 2 cm
acima das amostras em um dispositivo de aceleração de
20 partículas PDS 1000®.

Agrobacterium tumefaciens linhagem EHA105 desarmada é
usada em todos os experimentos de transformação. Um vetor
de plasmídeo binário compreendendo o cassete de expressão
25 que contém o gene ARGOS operacionalmente ligado ao promotor

de ubiquitina é introduzido em *Agrobacterium* linhagem EHA105 via congelamento e descongelamento como descrito por Holsters, et al., (1978) *Mol. Gen. Genet.* 163:181-187. Esse plasmídio compreende ainda um gene marcador de seleção para canamicina (i.e., *nptII*). As bactérias para experimentos de transformação vegetal são cultivadas de um dia para o outro (28°C e 100 RPM de agitação contínua) em meio líquido YEP (estrato de levedura a 10 gm/l, Bactopeptona a 10 gm/l, e NaCl a 5 gm/l, pH 7,0) com os antibióticos apropriados necessários para manutenção de linhagem bacteriana e plasmídio binário. A suspensão é usada quando alcança uma OD₆₀₀ de cerca de 0,4 a 0,8. As células de *Agrobacterium* são empelotadas e ressuspensas a uma OD₆₀₀ final de 0,5 em um meio de inoculação compreendido de MES 12,5 mM pH 5,7, NH₄Cl 1 gm/l, e MgSO₄ 0,3 gm/l.

Explantos frescos bombardeados são colocados em uma suspensão de *Agrobacterium*, misturados, e deixados sem perturbação por 30 minutos. Os explantes são, então, transferidos para meio GBA e co-cultivados, cortados com a superfície para baixo, a 26°C e dias de 18 horas. Após três dias de co-cultivo, os explantes são transferidos para 374B (meio GBA sem reguladores de crescimento e um nível reduzido de sacarose de 1%) suplementado com cefotaxima 250 mg/l e sulfato de canamicina 50 mg/l. Os explantes são

cultivados por duas a cinco semanas em seleção e, então, transferidos para meio fresco 374B sem canamicina por uma a duas semanas de desenvolvimento continuado. Explantes com áreas de crescimento diferenciadas resistentes a

5 antibióticos que não produziram brotos adequados para excisão são transferidos para meio GBA contendo 250 mg/l cefotaxime por um segundo tratamento de 3 dias com fito hormônio. Amostras de folhas de brotos verdes resistentes a canamicina são testadas para a presença de NPTII por

10 ELISA e para a presença de expressão transgene testando-se para modulação em desenvolvimento meristemático (i.e., uma alteração de tamanho e aparência de broto e meristemas florais).

15 Brotos positivos para NPTII são transplantados para estoque de raiz de plântulas de girassol Pioneer® hybrid 6440 cultivadas *in vitro*. Sementes com a superfície esterilizada são germinadas em meio 48-0 (sais Murashige and Skoog meia-força, sacarose 0,5%, gelrite 0,3%, pH 5,6)

20 e cultivadas sob condições descritas para cultivo de explantes. A porção superior da plântula é removida, uma fatia vertical de 1 cm é feita no hipocótilo, e o broto transformado inserido no corte. A área toda é embalada com parafilme para segurar o broto. Plantas enxertadas podem

25 ser transferidas para solo após uma semana de cultivo *in*

vitro. Enxertos em solo são mantidos sob condições de alta umidade, seguido por uma aclimação lenta ao ambiente de estufa. Setores transformados de plantas T₀ (geração parental) amadurecendo na estufa são identificados por
5 NPTII ELISA e/ou por análise de atividade de ARGOS de extratos de folha, enquanto sementes transgênicas colhidas de plantas T₀ positivas para NPTII são identificadas por análise de atividade de ARGOS de pequenas porções de cotilédones de semente seca.

10

Um protocolo de transformação de girassol alternativo permite a recuperação de progênie transgênica sem o uso de pressão de seleção química. Sementes são debulhadas e têm a superfície esterilizada por 20 minutos em uma solução
15 alvejante de Clorox 20% com a adição de duas a três gotas de Tween 20 por 100 ml de solução, então enxaguadas três vezes com água destilada. Sementes esterilizadas são embebidas no escuro a 26°C por 20 horas em filtro de papel molhado com água. Os cotilédones e radicais de raiz são
20 removidos, e os explantes de meristema são cultivados em 374E (meio GBA consistindo de sais MS, vitaminas Shepard, sulfato de adenina 40 mg/l, sacarose 3%, 6-BAP 0,5 mg/l, IAA 0,25 mg/l, GA 0,1 mg/l, e *Phytagar* 0,8% em pH 5,6) por 24 horas no escuro. As folhas primárias são removidas para
25 expor o meristema apical, em torno de 40 explantes são

colocados com a cúpula apical voltadas para cima em um círculo de 2 cm no centro de 374M (meio GBA com *Phytagar* a 1,2%), e, então, cultivados em meio por 24 horas no escuro.

5 Aproximadamente 18,8 mg de partículas de tungstênio de 1,8 μ m são ressuspensos em 150 μ l de etanol absoluto. Após a sonicação, 8 μ l são colocados no centro da superfície do macrocarregador. Cada placa é bombardeada duas vezes com discos de ruptura a 650 psi na primeira estante a 26 mm de
10 Hg de vácuo de hélio.

O plasmídeo de interesse é introduzido em *Agrobacterium tumefaciens* linhagem EHA105 via congelamento e descongelamento como descrito previamente. A pelota de
15 bactérias cultivada de um dia para o outro a 28°C em um meio líquido YEP (extrato de leveduras 10 g/l, Bactopeptona 10 g/l, e NaCl 5 g/l, pH 7,0) na presença de canamicina 50 μ g/l é ressuspensa em um meio de inoculação (ácido etanossulfônico 12,5 mM 2-mM 2-(N-morpholino), MES, NH₄Cl 1
20 g/l e MgSO₄ 0,3 g/l em pH 5,7) para alcançar uma concentração final de 4,0 em OD 600. Explantes bombardeados com partículas são transferidos para meio GBA (374E), e uma gotícula de suspensão de bactérias é colocada diretamente em cima do meristema. Os explantes são co-cultivados em
25 meio por 4 dias, após os quais os explantes são

transferidos para meio 374C (GBA com sacarose 1% e sem BAP, IAA, GA3 e suplementado com cefotaxime 250 µg/ml). As plântulas são cultivadas no meio por cerca de duas semanas sob dias condições de incubação de 16 horas e 26°C.

5

Explantes (em torno de 2 cm de comprimento) de cultura de duas semanas em meio 374C são rastreados para um desenvolvimento de meristema (i.e., uma alteração de tamanho e aparência de broto e meristemas florais). Após

10 explantes positivos serem identificados (i.e., uma mudança na expressão de ARGOS), aqueles brotos que falharam em exibir atividade de ARGOS são descartados, e cada explante positivo é subdividido em explantes nodais. Um explante nodal contém pelo menos um nodo potencial. Os segmentos

15 nodais são cultivados em meio GBA por três a quatro dias para promover a formação de botões auxiliares a partir de cada nodo. Então, eles são transferidos para meio 374C e deixados se desenvolver por quatro semanas adicionais. Botões em desenvolvimento são separados e cultivados por

20 quatro semanas adicionais em meio 374C. Amostras de folhas tiradas de cada broto recém recuperado são rastreadas novamente pelo teste de atividade de proteína apropriado. Neste momento, os brotos positivos recuperados a partir de um único nodo terão sido geralmente enriquecidos no setor

transgênico detectado no teste inicial antes da cultura nodal.

Broto recuperados positivos para expressão de ARGOS
5 alterada são enxertados para estoque de raiz de plântulas
de girassol *Pioneer hybrid 6440* cultivadas *in vitro*. Os
estoques de raiz são preparados da seguinte maneira.
Sementes são debulhadas e têm a superfície esterilizada por
20 minutos em uma solução alvejante de Clorox 20% com a
10 adição de duas a três gotas de Tween 20 por 100 ml de
solução, e são enxaguadas três vezes com água destilada.
As sementes esterilizadas são germinadas no filtro molhado
com água por três dias, então, elas são transferidas em
meio 48 (sal MS meia-força, sacarose 0,5%, gelrite 0,3% pH
15 5,0) e cultivadas a 26°C no escuro por três dias, então
incubadas em condições de cultivo de dias de 16 horas. A
porção superior de plântulas selecionadas é removida, uma
fatia vertical é feita em cada hipocótilo, e um broto
transformado é inserido em um corte em V. A área de corte é
20 embalada com parafilme. Após uma semana de cultivo no
meio, as plantas enxertadas são transferidas para solo.
Nas primeiras duas semanas, elas são mantidas sob condições
de alta umidade para se aclimatar a um ambiente de estufa.

Exemplo 9. Variantes de seqüências ARGOS

A. *Seqüências de nucleotídeos variantes de ARGOS que não alteram a seqüência de aminoácidos codificada*

5

As seqüências de nucleotídeos de ARGOS são usadas para gerar seqüências de nucleotídeos variantes tendo a seqüência de nucleotídeos do quadro de iniciação de leitura com cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90% e 95% de identidade de seqüência de nucleotídeo quando comparada à seqüência de nucleotídeos de ORF não alterado da SEQ ID NO correspondente. Esses variantes funcionais são gerados usando uma tabela de códon padrão. Enquanto a seqüência de nucleotídeos dos variantes são alterados, a seqüência de aminoácidos codificada pelos quadros de iniciação de leitura não mudam.

10
15

B. *Seqüências de aminoácidos variantes de polipeptídeos ARGOS*

20

Seqüências de aminoácidos variantes dos polipeptídeos ARGOS são geradas. Neste exemplo, um aminoácido é alterado. Especificamente, os quadros de iniciação de leitura são revisados para determinar a alteração de aminoácido apropriada. A seleção do aminoácido a ser

25

mudado é feita consultando o alinhamento de proteína (com os outros ortólogos e outros membros da família de genes de várias espécies). Um aminoácido é selecionado o qual se supões não estar sob alta pressão de seleção (não altamente conservado) e que é, ao contrário, facilmente substituído por um aminoácido com características químicas similares (i.e., cadeia lateral funcional similar). Usando o alinhamento de proteína apresentado na Figura 2, um aminoácido apropriado pode ser mudado. Uma vez o aminoácido visado é identificado, o procedimento destacado na seção C, a seguir, é seguido. Variantes tendo cerca de 70%, 75%, 80%, 85%, 90% e 95% de identidade de seqüência de ácidos nucleicos são gerados usando este método.

15 C. *Seqüências de aminoácidos variantes adicionais de polipeptídeos ARGOS*

Neste exemplo, seqüências de proteínas artificiais são criadas tendo 80%, 85%, 90% e 95% de identidade em relação à seqüência de proteínas referência. Este último esforço requer identificar regiões conservadas e variáveis a partir do alinhamento apresentado na Figura 2 e, então, a aplicação judiciosa de uma tabela de substituições de aminoácidos. Estas partes serão discutidas em mais detalhes abaixo.

Amplamente, a determinação de quais seqüências de aminoácidos são alteradas é feita baseada nas regiões conservadas entre proteína ARGOS ou entre os outros polipeptídeos ARGOS. Baseado no alinhamento de seqüência, as várias regiões do polipeptídeo ARGOS que podem ser provavelmente alteradas estão representadas em letras minúsculas, enquanto as regiões conservadas estão representadas por letras maiúsculas. É reconhecido que substituições conservadas podem ser feitas nas regiões conservadas abaixo sem alterar a função. Além disso, um especialista entenderá que variantes funcionais da seqüência ARGOS da invenção podem ter alterações de aminoácidos não conservadas menores no domínio conservado.

15

Seqüências de proteínas artificiais são, então, criadas, as quais são diferentes da original nos intervalos de 80-85%, 85-90%, 90-95% e 95-100% de identidade. Pontos médios desses intervalos são visados, com amplitude liberal de mais ou menos 1%, por exemplo. As substituições de aminoácidos serão efetuadas por um *Perl script* padrão. A tabela de substituições é provida abaixo na Tabela 3.

20

Tabela 3. Tabela de substituições

Aminoácido	Substituição Fortemente Similar e ótima	Rank de Ordem para Mudar	Comentário
I	L,V	1	Substituição 50:50
L	I,V	2	Substituição 50:50
V	I,L	3	Substituição 50:50
A	G	4	
G	A	5	
D	E	6	
E	D	7	
W	Y	8	
Y	W	9	
S	T	10	
T	S	11	
K	R	12	
R	K	13	
N	Q	14	
Q	N	15	
F	Y	16	
M	L	17	Primeira metionina não pode mudar
H		Na	Sem bons substitutos
C		Na	Sem bons substitutos
P		Na	Sem bons substitutos

Primeiro, quaisquer aminoácidos conservados na proteína que não deveriam ser mudados são identificados e

"cortados" para insulação da substituição. A metionina de início será, obviamente, adicionada a esta lista automaticamente. Em seguida, as mudanças são feitas.

5 H, C e P não são mudados em qualquer circunstância. As mudanças ocorrerão, primeiro, com isoleucina, varrendo do N-terminal para C-terminal. Então, leucina, e daí para o final da lista até o que alvo desejado seja alcançado. Numerosas substituições interinas podem ser feitas de forma
10 a não causar a reversão de mudanças. A lista é ordenada de 1-17, então começa com tantas mudanças de isoleucina como necessário antes de leucina, e daí até metionina. Claramente, vários aminoácidos não precisarão, desta maneira, ser mudados. L, I e V envolverão uma substituição
15 50:50 das duas substituições ótimas alternativas.

 As seqüências de aminoácidos variantes são escritas como resultado. *Perl script* é usado para calcular as identidades percentuais. Usando esse procedimento,
20 variantes dos polipeptídeos ARGOS são gerados tendo cerca de 80%, 85%, 90% e 95% de identidade de aminoácidos em relação à seqüência de nucleotídeos inicial de ORF não alterado de SEQ ID NOS: 1, 3, 5 e 40-71.

Todas as publicações e aplicações de patentes nesta especificação são indicativas do nível daqueles especialistas na técnica a qual esta invenção pertence. Todas as publicações e aplicações de patentes são aqui
5 incorporadas por referência na mesma extensão como se cada publicação ou aplicação de patente individual fosse especificamente e individualmente indicada por referência.

A invenção foi descrita com referência a vários
10 avanços e técnicas específicas e preferenciais. Contudo, deveria ser entendido que várias mudanças e modificações podem ser feitas permanecendo no espírito e escopo da invenção.

Listagem de Sequências

<110> Requerente: Pioneer Hi-Bred International, Inc.

<120> Título: POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, CASSETE DE EXPRESSÃO, MÉTODO PARA MODULAR O TAMANHO DE ÓRGÃOS EM PLANTAS, MÉTODO DE MODULAR TODA A PLANTA OU O TAMANHO DE ÓRGÃO EM UMA PLANTA, PRODUTO

<130> Referência do documento: P1428

<150> Documento de prioridade: 60/788,123

<151> Data de depósito: 31-03-2006

<160> Quantidade de SEQ ID NOs.: 71

<170> Software: FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> SEQ ID NO: SEQ ID NO: 1

<211> Comprimento: 879

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Zea mays

<400> Sequência: 1

```

tttttagcta gctagatctg gcctgattcg ccgatcgagc ggtgggtgaga cggagtgcctt 60
cagctcaaag actgctagtgt gtaggctggt agctagctgt gtgcctgtgt gcagtgtgca 120
ctgccactgc atgcgcggcg ccttggaactt aagacggcag cacacgcacg cgaggaggcg 180
tcggctgaag cgagcgcctcc ggcggctccg cttecgctcat caggttcttg agccccggaa 240
acgatgagca cgacccggcc ggaggacacc cagcaactga tcaacagtgc cgccgctagc 300
cccaaccgca gcgcaccgtc cgccgcgccc agcgatatgg agaggggcag cggaaccgcc 360
gcgtcctcgt cgcgcgcttc gacgacgtct cactcccacc agagggccac ccacaggggtg 420
gtggaggagg aggaggagga ggagcctagt agcagccgtg gcggcggcag cctctgctcc 480
gggtacctgt cgctcccggc tctgctgctc gtcggcgctca ccgcgtcgct ggtgatcctc 540
cgctcgtcc tgcccccgct gccgcgcgcg ccgtcgatgc tgatgctggt ccccgctggca 600
atgctgctcc tgctgctcgt gctggcgctt atgccacgt cgtccaccgg cggccgcggt 660
ggaaccggac cgacctacat gtagataatc acatcggttt tttttttcct ttctttctct 720
tgctgcctct tcgtttggat tttgtgacag agggaggtct tgcgatggat cagttagtcc 780
tcagcttctg ctcttctcga tcgtacgatg tctctgttcg gctaattaat ttgcataggg 840
gtatatatat gctgcctaga tcttaaaagt atctcgtgc 879

```

<210> SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2

<211> Comprimento: 146

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Zea mays

<400> Sequência: 2

```

Met Ser Thr Thr Arg Pro Glu Asp Thr Gln Gln Leu Ile Asn Ser Ala
1           5           10           15
Ala Ala Ser Pro Asn Arg Ser Ala Pro Ser Ala Ala Pro Ser Asp Met
20           25           30
Glu Arg Gly Ser Gly Thr Ala Ala Ser Ser Ser Arg Ala Ser Thr Thr
35           40           45
Ser His Ser His Gln Arg Ala Thr His Arg Val Val Glu Glu Glu Glu

```

50 55 60
 Glu Glu Glu Pro Ser Ser Ser Arg Gly Gly Gly Ser Leu Cys Ser Gly
 65 70 75 80
 Tyr Leu Ser Leu Pro Ala Leu Leu Leu Val Gly Val Thr Ala Ser Leu
 85 90 95
 Val Ile Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ser Met
 100 105 110
 Leu Met Leu Val Pro Val Ala Met Leu Leu Leu Leu Leu Val Leu Ala
 115 120 125
 10 Phe Met Pro Thr Ser Ser Thr Gly Gly Arg Gly Gly Thr Gly Pro Thr
 130 135 140
 Tyr Met
 145

15

<210> SEQ ID NO: SEQ ID NO: 3
 <211> Comprimento: 936
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Zea mays

20

<400> Sequência: 3
 caacgtccaa cccctcttgt ctctcgtcta cctctcttct gccctcttgc gtccgtgtct 60
 ccctcgtcgt cgctgcgtga ggttgacgac gaccagtcac aggatctgtt cgttcctcat 120
 gcgaccagc tagctaaaac tggcatgcat ggacatgcta cgctgctgcg tcaatccatc 180
 25 tcaccagcag tgctagctag ctagatctgg cctgattcgc cgatcgagcg gtcgccggtc 240
 agagactcag agttcatgag acggagtgtc tcagctcaaa gactgctagt ggtagctagg 300
 tagctgcgtg cactgcatgc gcgggcgctt ggacttgaag aaaccgagcg ctccgatagt 360
 ccgatccgga aacgatgagt gccgggcccgg aggacacca gcagctgac aacagtgccg 420
 ccgctagccc caaccgcagc gcaccgtccg ccgcgccag cgatatggag aggggcagcg 480
 30 gaaccgccgc gtcctcgtcg cgcgcttcga cgacgtcca ctcccaccag agggccacc 540
 acaggggtgt ggaggaggag gaggaggagc ctagtagcag ccgtggcgcc ggcagcctct 600
 gctccgggta cctgtcgctt ccggtcttgc tgctcgtcgg cgtcaccgcg tcgctgggtga 660
 tcctcccgtc cgtcctgccc ccgctgccgc cgccgccgtc gttgctgatg ctgggtccccg 720
 tggcaatgct gtcctgctg ctcgtgctgg cgttcatgcc cagctcgtcc accggcgggc 780
 35 gcggtggaac cggaccgacc tacatgtaga taatcacatc ggtttttttt tttttccttt 840
 ctttctcttg tcgtcctttc gtttgattt tgtgacagag ggaggtcttg cgatggatca 900
 gtttagtcctc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 936

40

<210> SEQ ID NO: SEQ ID NO: 4
 <211> Comprimento: 144
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Zea mays

45

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

Ser Leu Pro Ala Leu Leu Leu Val Gly Val Thr Ala Ser Leu Val Ile
 85 90 95
 Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ser Leu Leu Met
 100 105 110
 5 Leu Val Pro Val Ala Met Leu Leu Leu Leu Leu Val Leu Ala Phe Met
 115 120 125
 Pro Thr Ser Ser Thr Gly Gly Arg Gly Gly Thr Gly Pro Thr Tyr Met
 130 135 140

10

<210> SEQ ID NO: SEQ ID NO: 5
 <211> Comprimento: 1067
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Zea mays

15

<400> Sequência: 5
 ctccatcctt ccccccgga gcaggagctg cagccaggag tcgagtcggc gtcgtcacgg 60
 gagatatcag cttcgctatc accggatccc ccctctgctc cctccgcacc tcccatctgc 120
 gctctctgtt ttcttccgcg caccgccggt gttggtgtcc cgtccggcgg cgttgctggt 180
 20 ggctgaatcc gagcctttga ggggtctccc gccgccgccg ctcttgagat ctctttattg 240
 atctggaggg attaaagagg gattcttgcc ttcctactgg agcaagagaa aggggagAAC 300
 gtgtttcttc aggcgtgggt gaacagttag gaccggagaa caatgcgagg ttcgggattt 360
 aagatgttct ggctttaggg gccgttcttc tgaagcaggg gacgggcatg tcgaccaccg 420
 gagctcagat ctgattacaa aacgttcaga aaacacaagg cgttctcaca ccgcctttca 480
 25 cttcttgctt actttggcaa ccactcactg cgactggtct ccacctccac ctacaccaa 540
 gaacacatgg caagccgatc tagcgcgatg gaaggagggg cggcaataca aaggaggaat 600
 gccgtgaagc ggcatctgca gcagcgtcag caggaggcgg atttcctcga caagaaggtc 660
 atcgcgacca cctacttcag catcgggcg ttcctcgtgc tcgcctgcct caccgtctcg 720
 ctgctgatac tgccgctggt gctgcctccc ctgccgccgc cgcctgcgt gctgctgtgg 780
 30 ctgccggtct gcctgctcgt cttgctgggt gtactggcct tcatgccgac agatgtgcgc 840
 agcatggcct cctcttacct gtaaatagat aaatagggtc tggccagatt ttctgtgttt 900
 tgcagctgca ggattcgtcc taagacgagt catgagtgtg atgtgaagca acttctccag 960
 ggatagatct caaccaagtt tggtagccat acgaagttat tgactggaat ttagaacata 1020
 tagttgtgca caatttcgaa catatcttgt agtggagagc gggccga 1067

35

<210> SEQ ID NO: SEQ ID NO: 6
 <211> Comprimento: 105
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Zea mays

40

<400> Sequência: 6
 Met Ala Ser Arg Ser Ser Ala Met Glu Gly Gly Ala Ala Ile Gln Arg
 1 5 10 15
 45 Arg Asn Ala Val Lys Arg His Leu Gln Gln Arg Gln Gln Glu Ala Asp
 20 25 30
 Phe Leu Asp Lys Lys Val Ile Ala Ser Thr Tyr Phe Ser Ile Gly Ala
 35 40 45
 Phe Leu Val Leu Ala Cys Leu Thr Val Ser Leu Leu Ile Leu Pro Leu
 50 55 60
 Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Ser Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 65 70 75 80
 Val Cys Leu Leu Val Leu Leu Val Val Leu Ala Phe Met Pro Thr Asp
 85 90 95
 55 Val Arg Ser Met Ala Ser Ser Tyr Leu

100

105

<210> SEQ ID NO: SEQ ID NO: 7

5 <211> Comprimento: 152

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Zea mays

<400> Sequência: 7

10 Met Cys Arg Gly Leu Pro Thr Pro Ala Pro Ala Pro Ala Leu Gln Phe
 1 5 10 15
 Gln Ser Gln Asp Cys Ser Arg Gln Gln Arg Gly Thr Thr Gln Ala Pro
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ala Ser Glu Ser Val Arg Ala Cys Met Ala Ala Glu Arg
 15 35 40 45
 Lys Ala Ala Ser Arg Pro Ala Ala Cys Gly Arg Met Arg Gly Ala Glu
 50 55 60
 Gly Ala Lys Pro Arg Gly Arg Gln Ala Lys Ala Ala Arg Ala Pro Pro
 65 70 75 80
 20 Gly Gln Gly Tyr Phe Thr Ala Gly Leu Ala Ala Leu Phe Leu Cys Leu
 85 90 95
 Thr Thr Leu Leu Val Phe Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro
 100 105 110
 Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Val Pro Val Gly Leu Met Ala Val Leu
 25 115 120 125
 Leu Ala Leu Ala Leu Val Pro Ser Asp Gly Arg Ala Ala Ala Ala Ala
 130 135 140
 Val Ala Ser Ser Ser Cys Val Cys
 145 150

30

<210> SEQ ID NO: 8

<211> Comprimento: Comprimento: 119

<212> Tipo: PRT

35 <213> Organismo: Zea mays

<400> Sequência: 8

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

<210> SEQ ID NO: 9
 <211> Comprimento: 64
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Zea mays

5

<400> Sequência: 9

Met Ser Lys Arg Val Leu Met Met Leu Leu Ala Ala Thr Val Ile Leu
 1 5 10 15
 Leu Cys Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Leu Phe
 20 25 30
 Leu Leu Phe Val Pro Val Val Met Leu Leu Leu Phe Ser Leu Val
 35 40 45
 Phe Phe Pro Ser Asn His Cys Pro Cys Ser Ser Pro Thr Phe Thr Gln
 50 55 60

15

<210> SEQ ID NO: 10
 <211> Comprimento: 106
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Zea mays

20

<400> Sequência: 10

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

40

<210> SEQ ID NO: 11
 <211> Comprimento: 118
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Zea mays

45

<400> Sequência: 11

Met Met Leu His Cys Thr Phe Ala Ile Ser Glu Ala Pro Ala Arg Ala
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Gly Gln Val Ser Val Met Arg Ala Met Pro Gln Glu Glu
 20 25 30
 Glu Ala Ala Val Ala Thr Thr Thr Met Ala Gly Gly Lys Val Ala Ala
 35 40 45
 Leu Leu Ala Thr Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu
 50 55 60
 Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Thr Gln Leu Leu Phe Val Pro Val Val

55

65 70 75 80
 Leu Leu Leu Leu Val Ala Ser Leu Ala Phe Cys Pro Ala Ala Thr Ser
 85 90 95
 Ser Pro Ser Pro Met His Ala Ala Asp His Gly Ser Phe Gly Thr Thr
 5 100 105 110
 Gly Ser Pro His Leu Cys
 115

10 <210> SEQ ID NO: 12
 <211> Comprimento: 126
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Zea mays

15 <400> Sequência: 12
 Met Pro Val Ala Ser Ser Leu Met Ala Met Glu Leu Glu Thr Asp Gln
 1 5 10 15
 Leu Ala Trp Ala Glu Gln Gln Arg Gln Gln Asn Arg Arg Gln Thr Met
 20 25 30
 20 Val Val Cys Arg Lys Ser Asp Ala Ala Val Ala Lys Gly Gln Gln Arg
 35 40 45
 Gln Asn Ala Ser Pro Pro Ser Pro Lys Pro Pro Pro Ala Gly Gly Leu
 50 55 60
 Ser Ala Glu Ala Phe Leu Val Leu Ala Cys Val Ala Val Ser Leu Ile
 25 65 70 75 80
 Val Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Ser Pro Pro Pro Pro Leu Leu
 85 90 95
 Leu Leu Val Pro Val Cys Leu Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ala Thr
 100 105 110
 30 Phe Val Pro Ser Asp Val Arg Ser Met Pro Ser Ser Asn Leu
 115 120 125

35 <210> SEQ ID NO: 13
 <211> Comprimento: 103
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Oryza sativa

40 <400> Sequência: 13
 Met Lys Thr Thr Leu Ala Val Val Glu Gly Thr Arg Ala His Ile Val
 1 5 10 15
 Asn Leu Ala Asn Ser Arg Ala Ser Arg Leu Asn Glu Arg Leu Ile Asp
 20 25 30
 Pro Ala Ile Glu Ser Arg Ser Ile Ala Gly Ala Thr Pro Ala Pro Phe
 45 35 40 45
 Glu Met Glu Thr Ala Met Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu Val Ala Phe
 50 55 60
 Leu Leu Cys Tyr Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Ser Pro Pro
 50 65 70 75 80
 Ala Leu Phe Ile Trp Ile Pro Val Phe Met Leu Leu Leu Leu Phe Ala
 85 90 95
 Leu Ala Leu Phe Pro Val Gln
 100

<210> SEQ ID NO: 14
 <211> Comprimento: 68
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Oryza sativa

5

<400> Sequência: 14

Met	Val	Met	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
1				5					10					15	
Pro	Leu	Leu	Leu	Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu
			20					25					30		
Val	Pro	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro
		35					40					45			
Asn	Arg	Asp	Val	Val	Val	Tyr	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Ala	Asp	Gln	Phe
	50					55					60				
Phe	Phe	Arg	Gln												
65															

<210> SEQ ID NO: 15
 <211> Comprimento: 147
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Oryza sativa

<400> Sequência: 15

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

45

<210> SEQ ID NO: 16
 <211> Comprimento: 130
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Oryza sativa

<400> Sequência: 16

Met	Glu	Lys	Gly	Arg	Gly	Lys	Ala	Cys	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro
1				5					10					15	
Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Ser	Gly	Lys	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly

55

		20		25		30	
	Ser	Asn	Ile	Arg	Glu	Ala	Ala
		35		40		45	
5	Gly	Lys	Tyr	Phe	Ser	Val	Glu
		50		55		60	
	Ala	Ser	Leu	Val	Ile	Leu	Pro
	65			70		75	
	Pro	Ser	Met	Leu	Met	Leu	Val
			85		90		
10	Ala	Leu	Ala	Phe	Met	Pro	Thr
			100		105		
	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Arg	Asn
		115		120		125	
	Tyr	Leu					
15		130					

<210> SEQ ID NO: 17

<211> Comprimento: 127

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Oryza sativa

<400> Sequência: 17

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

<210> SEQ ID NO: 18

<211> Comprimento: 105

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Zea mays

<400> Sequência: 18

50	Met	Gln	Glu	Glu	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Pro	Val
	1				5					10					15	
	Met	Asp	Gly	Gly	Lys	Ala	Met	Ala	Val	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Ala	Ala
			20					25					30			
	Val	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Val	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
			35				40				45					
	Pro	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Ser	Leu	Ala	Phe	Phe	Pro	Ala
55		50				55					60					

Ala Gly Ser Asp Gly Val Val Ala Ala Ala Ala Val Ala Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala Arg Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser
 85 90 95
 5 Ser Ser Ser Ser Ser Ser Arg Gln Leu
 100 105

10 <210> SEQ ID NO: 19
 <211> Comprimento: 105
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Oryza sativa

15 <400> Sequência: 19
 Met Glu Gly Val Gly Ala Arg Gln Arg Arg Asn Pro Leu Ile Pro Arg
 1 5 10 15
 Pro Asn Gly Ser Lys Arg His Leu Gln His Gln His Gln Pro Asn Ala
 20 25 30
 20 Ala Glu Lys Lys Thr Ala Ala Thr Ser Asn Tyr Phe Ser Ile Glu Ala
 35 40 45
 Phe Leu Val Leu Val Phe Leu Thr Met Ser Leu Leu Ile Leu Pro Leu
 50 55 60
 Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Pro
 65 70 75 80
 25 Val Cys Leu Leu Ile Leu Leu Val Val Leu Ala Phe Met Pro Thr Asp
 85 90 95
 Val Arg Ser Met Ala Ser Ser Tyr Leu
 100 105

30 <210> SEQ ID NO: 20
 <211> Comprimento: 120
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Oryza sativa

35 <400> Sequência: 20
 Met Glu Glu Gln Met Phe Arg Glu Gln Gln Met Gln Arg Gly Gly Arg
 1 5 10 15
 His His Gln His His Thr Thr Arg Glu Gln Glu Gln Gln Lys Gln
 20 25 30
 40 Gln Gln Arg Arg Arg Leu Met Asn Asn Ala Thr Asn Gly Gly Gly Gly
 35 40 45
 Asp Gly Gly Ser Arg Cys Tyr Phe Ser Thr Glu Ala Ile Leu Val Leu
 50 55 60
 45 Ala Cys Val Thr Val Ser Leu Leu Val Leu Pro Leu Ile Leu Pro Pro
 65 70 75 80
 Leu Pro Pro Pro Pro Thr Leu Leu Leu Leu Leu Pro Val Cys Leu Leu
 85 90 95
 Ala Leu Leu Val Val Leu Ala Phe Met Pro Thr Asp Met Arg Thr Met
 100 105 110
 50 Ala Ser Ser Tyr Phe Phe Cys Leu
 115 120

<210> SEQ ID NO: 21

<211> Comprimento: 96

<212> Tipo: PRT

5 <213> Organismo: Glycine max

<400> Sequência: 21

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

<210> SEQ ID NO: 22

<211> Comprimento: 96

<212> Tipo: PRT

25 <213> Organismo: Glycine max

<400> Sequência: 22

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

<210> SEQ ID NO: 23

<211> Comprimento: 66

<212> Tipo: PRT

45 <213> Organismo: Glycine max

<400> Sequência: 23

	Met	Ala	Arg	Cys	Phe	Gly	Leu	Gly	Ser	Val	Leu	Val	Leu	Ala	Ala	Leu
	1				5					10					15	
50	Ala	Ala	Ser	Met	Val	Val	Leu	Pro	Leu	Met	Leu	Pro	Pro	Leu	Pro	Pro
			20					25						30		
	Pro	Pro	Leu	Val	Leu	Leu	Phe	Phe	Pro	Val	Gly	Ile	Met	Ala	Ala	Leu
			35					40					45			
55	Met	Leu	Leu	Ala	Phe	Ser	Pro	Ser	Asp	Gln	Asn	Gly	Val	Val	Tyr	Ala
	50						55					60				

Ser Thr
65

5 <210> SEQ ID NO: 24
<211> Comprimento: 66
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Glycine max

10 <400> Sequência: 24
Met Ala Arg Cys Phe Gly Leu Gly Ser Val Leu Val Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15
Ala Ala Ser Met Val Val Leu Pro Leu Met Leu Pro Pro Leu Pro Pro
20 25 30
15 Pro Pro Leu Val Phe Phe Phe Phe Pro Val Gly Ile Met Ala Ala Leu
35 40 45
Met Leu Leu Val Phe Ser Pro Ser Asp Gln Asn Gly Val Val Tyr Ala
50 55 60
Thr Thr
20 65

<210> SEQ ID NO: 25
<211> Comprimento: 90
25 <212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Glycine max

<400> Sequência: 25
30 Met Ser Ser Trp Leu Ile His Tyr Asn Lys Arg Phe Ile Ile Ser Ile
1 5 10 15
Ser Leu Ala Phe Met Leu Arg Leu Phe Gly Phe Lys Ser Thr Met Phe
20 25 30
Met Val Val Leu Thr Ile Ala Ile Leu Val Leu Pro Leu Met Leu Pro
35 35 40 45
Pro Leu Pro Pro Pro Pro Met Ile Leu Met Leu Val Pro Leu Val Ile
50 55 60
Met Leu Leu Leu Val Lys Leu Ala Leu Tyr Ser Lys His Gly Pro Ala
65 70 75 80
Asp Val Ile Tyr Gln Cys Asn Phe Thr Trp
40 85 90

<210> SEQ ID NO: 26
<211> Comprimento: 130
45 <212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 26
50 Met Ile Arg Glu Ile Ser Asn Leu Gln Lys Asp Ile Ile Asn Ile Gln
1 5 10 15
Asp Ser Tyr Ser Asn Asn Arg Val Met Asp Val Gly Arg Asn Asn Arg
20 25 30
Lys Asn Met Ser Phe Arg Ser Ser Pro Glu Lys Ser Lys Gln Glu Leu
35 40 45
55 Arg Arg Ser Phe Ser Ala Gln Lys Arg Met Met Ile Pro Ala Asn Tyr

50 55 60
Phe Ser Leu Glu Ser Leu Phe Leu Leu Val Gly Leu Thr Ala Ser Leu
65 70 75 80
Leu Ile Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Phe Met
85 90 95
Leu Leu Leu Val Pro Ile Gly Ile Met Val Leu Leu Val Val Leu Ala
100 105 110
Phe Met Pro Ser Ser His Ser Asn Ala Asn Thr Asp Val Thr Cys Asn
115 120 125
10 Phe Met
130

15 <210> SEQ ID NO: 27
<211> Comprimento: 135
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Arabidopsis thaliana

20 <400> Sequência: 27
Met Ile Arg Glu Phe Ser Ser Leu Gln Asn Asp Ile Ile Asn Ile Gln
1 5 10 15
Glu His Tyr Ser Leu Asn Asn Asn Met Asp Val Arg Gly Asp His Asn
20 25 30
Arg Lys Asn Thr Ser Phe Arg Gly Ser Ala Pro Ala Pro Ile Met Gly
35 40 45
Lys Gln Glu Leu Phe Arg Thr Leu Ser Ser Gln Asn Ser Pro Arg Arg
50 55 60
Leu Ile Ser Ala Ser Tyr Phe Ser Leu Glu Ser Met Val Val Leu Val
65 70 75 80
30 Gly Leu Thr Ala Ser Leu Leu Ile Leu Pro Leu Ile Leu Pro Pro Leu
85 90 95
Pro Pro Pro Pro Phe Met Leu Leu Leu Ile Pro Ile Gly Ile Met Val
100 105 110
Leu Leu Met Val Leu Ala Phe Met Pro Ser Ser Asn Ser Lys His Val
115 120 125
35 Ser Ser Ser Ser Thr Phe Met
130 135

40 <210> SEQ ID NO: 28
<211> Comprimento: 88
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Arabidopsis thaliana

45 <400> Sequência: 28
Met Arg Val His Asp Gln Arg Leu Arg Phe Asp Val Thr Pro Lys Pro
1 5 10 15
Met Gly Leu Asn Gly Ser Ser Leu Ile Thr Ala Arg Ser Val Ala Leu
20 25 30
50 Leu Leu Phe Leu Ser Leu Leu Leu Ile Leu Pro Pro Phe Leu Pro
35 40 45
Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ala Thr Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu
50 55 60
Met Ile Leu Leu Ile Phe Leu Ala Phe Ser Pro Ser Asn Glu Pro Ser
65 70 75 80

Leu Ala Val Glu Pro Leu Asp Pro
85

5 <210> SEQ ID NO: 29
<211> Comprimento: 146
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Sorghum bicolor

10 <400> Sequência: 29
Met Ser Thr Gly Arg Pro Glu Asp Ile Gln Gln Leu Ile Asn Ser Ala
1 5 10 15
Thr Ser Ser Pro Asn Arg Thr Ser Pro Ser Ala Ser Pro Ser Asp Met
20 25 30
15 Glu Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Ser Pro Arg Ala Ser Thr Ser Asp
35 40 45
Arg Arg Leu Gln Arg Ala Ala His Ser His Arg Glu Glu Trp Glu Pro
50 55 60
20 Ala Ala Ala Ala Ser Gly Asp Gly Gly Thr Gly Ser Leu Trp Ser Arg
65 70 75 80
Tyr Phe Ser Leu Pro Val Leu Leu Leu Val Gly Val Thr Ala Ser Leu
85 90 95
Val Ile Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ser Met
100 105 110
25 Leu Met Leu Val Pro Val Ala Met Leu Val Leu Leu Leu Val Leu Ala
115 120 125
Phe Met Pro Thr Ser Ser Val Arg Ala Gly Thr Gly Thr Gly Pro Thr
130 135 140
Tyr Met
30 145

<210> SEQ ID NO: 30
<211> Comprimento: 88
35 <212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Sorghum bicolor

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

<210> SEQ ID NO: 31
 <211> Comprimento: 107
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Sorghum bicolor

5
 <400> Sequência: 31
 Met Ala Ser Arg Ser Ser Ala Leu Glu Gly Gly Gly Ala Ala Ile Gln
 1 5 10 15
 Arg Arg Asn Asn Ala Val Lys Arg His Leu Gln Gln Arg Gln Gln Glu
 10 20 25 30
 Ala Asp Phe His Asp Lys Lys Val Ile Ala Ser Thr Tyr Phe Ser Ile
 35 40 45
 Gly Ala Phe Leu Val Leu Ala Cys Leu Thr Phe Ser Leu Leu Ile Leu
 50 55 60
 15 Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Ser Leu Leu Leu Trp
 65 70 75 80
 Leu Pro Val Cys Leu Leu Val Leu Leu Val Val Leu Ala Phe Met Pro
 85 90 95
 20 Thr Asp Val Arg Ser Val Ala Ala Ser Tyr Leu
 100 105

<210> SEQ ID NO: 32
 <211> Comprimento: 58
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Sorghum bicolor

25
 <400> Sequência: 32
 Met Met Leu Leu Val Ala Thr Val Ile Leu Leu Cys Leu Pro Leu Val
 30 1 5 10 15
 Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Leu Phe Leu Leu Phe Val Pro Val
 20 25 30
 Val Met Met Leu Leu Leu Phe Ser Leu Val Leu Phe Pro Ser His His
 35 35 40 45
 Cys Ala Cys Ser Ser Pro Thr Phe Thr Gln
 50 55

<210> SEQ ID NO: 33
 <211> Comprimento: 148
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Sorghum bicolor

40
 <400> Sequência: 33
 Met Ser Phe Val Ala Gly Ser Ser Glu Ala Asp Gln Leu Trp Phe Leu
 45 1 5 10 15
 Ile Pro Ser Glu Gln Ala Arg Ala His Ala Val Gln Pro His His Pro
 20 25 30
 Leu Ala Met Asp Arg Arg Ser Ser Ala Arg Arg Arg Gly Asp Pro His
 50 35 40 45
 Pro His Arg Arg Gly Ala Met His Gly Ala Ala Glu Gln Gln Lys Gln
 50 55 60
 Gln Gln Gln Arg Gly Arg Pro Gln Gly Thr Arg Ala Ala Pro Pro Val
 65 70 75 80
 55 Pro Pro Gly Tyr Phe Thr Ala Glu Leu Val Leu Ala Phe Leu Phe Val

85 90 95
 Ala Val Ser Leu Ala Phe Leu Pro Leu Val Leu Pro Pro Leu Ser Pro
 100 105 110
 5 Pro Pro Phe Leu Leu Leu Leu Val Pro Val Gly Leu Leu Ala Val Leu
 115 120 125
 Leu Ala Leu Ala Phe Val Pro Leu Asp Ala His Ser His Leu Val Val
 130 135 140
 Gly Ser Ser Arg
 145

10

<210> SEQ ID NO: 34

<211> Comprimento: 120

<212> Tipo: PRT

15 <213> Organismo: Sorghum bicolor

<400> Sequência: 34

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

35

<210> SEQ ID NO: 35

<211> Comprimento: 101

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Sorghum bicolor

40

<400> Sequência: 35

45 Met Arg Arg Ala Val Pro Gln Glu Glu Ala Val Ala Ala Ala Thr Thr
 1 5 10 15
 Thr Thr Met Asp Gly Gly Lys Val Val Ala Leu Leu Ala Thr Ala Ala
 20 25 30
 Ala Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Pro Pro Leu Pro Pro Pro
 35 40 45
 Pro Thr Gln Leu Leu Phe Val Pro Val Val Met Leu Leu Leu Val Ala
 50 55 60
 50 Ser Leu Ala Phe Cys Pro Thr Ala Ala Ser Ser Gly Gly Gly Gly Lys
 65 70 75 80
 Ser Lys Leu Ala Asp Ala Asp His Gly Ser Ser Phe Arg Thr Thr Gly
 85 90 95
 Ser Pro His Leu Arg
 100

55

<210> SEQ ID NO: 36
 <211> Comprimento: 106
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Sorghum bicolor

5

<400> Sequência: 36

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

20

<210> SEQ ID NO: 37
 <211> Comprimento: 72
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Sorghum bicolor

25

<400> Sequência: 37

Met	Glu	Arg	Ser	Met	Val	Thr	Met	Leu	Leu	Leu	Ala	Thr	Ala	Ala	Val
1				5				10						15	
Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Pro	Ser	Ser	Leu	Pro	Pro	Pro
			20					25					30		
Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Pro	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu
		35					40					45			
Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Thr	Arg	Asp	Asp	Asp	Asp	Ala	Ile	Ala	Ile
	50					55					60				
Tyr	Gly	Ser	Leu	Arg	Ser	Val	Gln								
	65				70										

40

<210> SEQ ID NO: 38
 <211> Comprimento: 13
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Artificial Sequence

45

<220> Características:
 <223> Outras informações: primer

<400> Sequência: Sequência: 38
 cgctagcccc aac

50

<210> SEQ ID NO: 39
 <211> Comprimento: 27
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Artificial Sequence

5

<220> Características:
 <223> Outras informações: primer

10

<400> Sequência: 39
 cacataaacac acaactttga tgccacac

27

15

<210> SEQ ID NO: 40
 <211> Comprimento: 459
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Zea mays

<400> Sequência: 40

20

atgtgccgcg gcctcccaac tccagctcca gctccagcgc ttcaatttca gtcccaggat 60
 tgcagtcggc agcagcgagg tactacccaa gcaccgcccg gccgagcgag cgagtcctgtg 120
 cgtgcgtgca tggcagcaga gaggaaggcg gcctcccgcg cggccgcctg cgggcgaatg 180
 cgccggcgccg aggggtgcaa gccgcggggc cgtcaggcaa aggcagcgcg ggcaccaccg 240
 ggccaggggt acttcacggc ggggctggcg gcgctgttcc tttgcctcac cacgctgctc 300
 gtgttctctg ctctcgtgct gccgcgcgtg ccgcgcgcgc cgttgctgct gctgctcgtg 360
 25 cccgtggggc tcatggctgt actgcttgcg ctggcgctcg tgccgtccga cggccggggc 420
 gccgcgcgcg ccgtcgcttc ttcacgtgct gtgtgctga 459

30

<210> SEQ ID NO: 41
 <211> Comprimento: 360
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Zea mays

<400> Sequência: 41

35

atgcacctgc tcgacgacct ccgccaagac cgccggcgcg cgcccgccca caccggcagc 60
 cgcagtcgca agccgcccc gcccttgcc gccgcgcgcg ccgcgcgcgc ggggggtccc 120
 gcgggctcct ccaccgccc caccgccacc cacctggggc cggaggcggc ggcgctgctg 180
 gcgtgcgtca cgccacgct gctgctgctt ccgctggtec tgccgcccct gccgcgcgcg 240
 ccgcgcgtcc tcctcctcgt gcccgtcgcc atcttcgcgc tcctgctact cctcgtgctc 300
 40 ctcccctccg acgcccgcgc cgccgtcgcc acgcccacct cctccgcctc ctacttgtag 360

45

<210> SEQ ID NO: 42
 <211> Comprimento: 195
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Zea mays

<400> Sequência: 42

50

atgagcaaga gagtactgat gatgttgctg gcggcgacag tgatcctcct gtgcctgccg 60
 ttggtgctgc cacccttcc gccaccaccg ctgtttcttc tcttcgtccc tgtgggtgatg 120
 atgctcctgc tcttctccct gggtttcttc ccgtctaacc actgtccatg ctcttctccg 180
 accttcactc agtaa 195

<210> SEQ ID NO: 43
 <211> Comprimento: 321
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Zea mays

5

<400> Sequência: 43
 atgccgtcat cgtcgcagac accgccgcgc cccggtcgga ggactgctgc tcacggcggc 60
 cggcacaagc acgacgatga cgacccaagc acgccgaggg gcttctgcgc caagtacttc 120
 tccaggaggat cgtgcctcct gctcgccctc gtcaccgtgc tgctgggtgg gctcccgcgc 180
 10 gtcctgccgc cgtcccgcgc gccgccgttg gcgctgctgc tcgtgccggc cgcaatgttg 240
 gcggtgctgc tgggtgctgc gctcatgccg gcggcgccag gtggccggaa cgaggctgtg 300
 gacccggcgt cgtacttgta g 321

15

<210> SEQ ID NO: 44
 <211> Comprimento: 357
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Zea mays

20

<400> Sequência: 44
 atgatgctgc actgcacatt tgctatatct gaggtcctg cgcgcgcctt ggcccttggc 60
 caggtgtctg tcatgcgggc gatgccgcag gaagaagaag ccgcggtggc gacgacgac 120
 atggccgggg gcaagggtgg gccgctgctg gccacggcgc ccgcgctgct gctgctgctc 180
 ccgctggcgc tgccgcgcgt gccgccgcgc cccacgcagc tgttggtcgt ccccggtggc 240
 25 ttgctgctcc tcgtggcgtc cctcgcgttc tgccccgcgc cgacctctc gccgtgcgcg 300
 atgcatgccg ccgaccacgg gtcgttcggg accactggat caccgcacct atgttga 357

30

<210> SEQ ID NO: 45
 <211> Comprimento: 381
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Zea mays

35

<400> Sequência: 45
 atgccggttg cttcgtcgtc aatggcgatg gagttggaga cggaccaact cgcctgggcg 60
 gagcagcagc ggcagcagaa taggaggcag accatggctg tctgcagaaa gagcgacgca 120
 gcggtggcca aagggcagca gcgtcagaac gcttcgcgcg cgtcgcccaa gcctccgccc 180
 gcgggcgggc tcagcgcgga ggcttcttg gttctggcgt gcgtcgccgt gtcgctcatc 240
 gtgctgccgc tggctctgcc gccgctgtcg ccccgccgcg ctctgctgct gctggtgccg 300
 40 gtgtgcctgc tcctgctcct cgccgcgctc gccaccttcg tgccgctcga tgtcaggagc 360
 atgccatcct ccaacttgta a 381

45

<210> SEQ ID NO: 46
 <211> Comprimento: 312
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Oryza sativa

50

<400> Sequência: 46
 atgaagacga ctttggtctg ggtggaagg accagggcac atattgttaa cctggcgaat 60
 tcaaggcgct ctcgattgaa cgaacggctg atcgatccag caatcgagtc tcgatcgatt 120
 gccggagcaa cacctgcgcc gtttgagatg gagacggcaa tgggtgctgct gctgcttgca 180
 ctggtcgcct tccttctctg ctacctctt gttctaccac cgctgccgcc ttcgcccccg 240
 gccctgttca tctggatacc ggtgttcatt ctgctcctgc tcttcgcctt tgccctcttc 300
 55 cctgttcagt aa 312

<210> SEQ ID NO: 47
 <211> Comprimento: 207
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Oryza sativa

5

<400> Sequência: 47

atggtgatgc ttctcctcgc tgcggcgggcg gtgctgctgc tgcctgctccc gctgctgctc 60
 ccgcccgtgc cgccgcgcgc gtcgctgctg ctgctcgtcc ccgtcgtgct gctgctggcg 120
 ctccttttccc tcgcttttcc ccccaaccgc gacgtcgtcg tctacggaca gcagccagct 180
 10 gcggatcaat tcttcttccg acaatga 207

<210> SEQ ID NO: 48
 <211> Comprimento: 444
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Oryza sativa

15

<400> Sequência: 48

atgagctttg caatccgcag ctctgagcct gaattcttgt tcttgatccc gtcggaagag 60
 20 gcagcagtag cagtcgcagc acatcggctg gtggtgatgg atcagaggag aagcggatca 120
 gcttatcgct ctaagcggac acatatggcg gcggcggagg acgagcaccg gcggccgggg 180
 acgtcgagcc gccgcggggt ggccgcgacg ccgacgacgc agacgcagac gcagacggcg 240
 cccggctact tcaccgtcga gctgggtgat gcgttcgtct gcgtgaccgc gtcgctcgtg 300
 ctgctgccgc tcgtcctgcc gccgttgccg ccgcgcgccg cgctgctgct ggtgggtgccg 360
 25 gtgtgcctgc tcgccgtcct ggtggccatg gcgttcgtcc cgctcgacgc gcagagcaac 420
 gtcgtcggct cgtcttgctt gtag 444

<210> SEQ ID NO: 49
 <211> Comprimento: 537
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Oryza sativa

30

<400> Sequência: 49

atgtacttgt tgagcccaag aaatggcgac gaggaggacg aacaggagga aatccaggag 60
 35 ctgatcagcg acgacgagcc gcccaatctc aagttggcat cctgcgccac tgcagccagc 120
 agcagcagca gcagcggcag cgacatggag aagggaagag gtaaagcctg cggcggcggg 180
 agtacggcgc cgccgcgcgc gccgcgctcg tcgtcaggta aatccggcgg cggcggcggc 240
 agcaatatca gggaggcggc ggctagcggc ggccggcgcg gcgtgtgggg caagtacttc 300
 40 tcggtggagt cgctgctcct gctgggtgtg gtgacggcgt cgctggtgat cctcccgtc 360
 gtgctgccgc cgctgcccc gccgcgctcg atgctgatgc tgggtgccgg ggcgatgctg 420
 gtgctgctgc tggcgctggc gttcatgccg acgacgacgt cgctcgtcgt gtccgcggcg 480
 ggcggcgggc gcggcgggcg caatggggcg acgacgggac atgctcccta cttgtag 537

45

<210> SEQ ID NO: 50
 <211> Comprimento: 384
 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Oryza sativa

50

<400> Sequência: 50

atgcgaggag tcattcttgc gcgttacgag gaggacgcca tggccgggca caggtccacg 60
 gcggcgggca cgggaggag attgtacgga caggtgggag tgaagcggag agtgggtggag 120
 gagacggcgg cggcgggtga agtaggcgga ggaggaggag ggtacttggg ggtggaggcg 180
 55 gcggtgctgc tcggggtggt gacggcgacg ctgctggtgc tgccgctgct gctgccgcgc 240

```

ctgccgccgc cgccgccgat gctgctgctc gtgcccgtcg ccatcttcgc cgtgctcctc 300
ctcctcgctc tgctgccctc cgacgccaa g tccatcgccg ccgctggccg accctcttct 360
tctcctcct cctcctacct gtag                                     384

```

5

```

<210> SEQ ID NO: 51
<211> Comprimento: 318
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Oryza sativa

```

10

```

<400> Sequência: 51
atgcaagaag aagcggcgctc gtcgtcgtcg tcgtcggcgt cgccgggtgat ggacggggggc 60
aaggcgatgg cggtgctgct ggcgggtggcg gccgcgggtgc tgctgctgct cccgctcgtg 120
ctgccgtcgc tgctgctgct cctccccgtg gtgctgctcc tgctgggtggg ttccctcgcc 180
15 ttcttccccg cgcccggcag cgacggcgctc gtcgccgccg ccgcggtcgc cggcacctac 240
cagccgccgc cgctccgcc tgctcggtcg tcaccgccgc cgtcgtcgtc gtcgtcatcg 300
tcgtcgcggc agctgtga                                     318

```

20

```

<210> SEQ ID NO: 52
<211> Comprimento: 318
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Oryza sativa

```

25

```

<400> Sequência: 52
atggaagggtg taggtgctag gcagaggagg aaccctctga taccagacc aaacggttca 60
aagaggcatc tgcagcatca gcatcagcca aatgctgccg agaagaagac cgccgcgaca 120
tcgaattact tcagtatcga ggcgttcctc gtgctcgtct tcctcaccat gtcattgctc 180
atacttccat tgggtgcttc cccattgcct ccgccgccat cgctgctgct gctgctgcc 240
30 gtctgcctgc tcatcctgct gggtgtgctg gccttcatgc caacggatgt gcggagcatg 300
gcttctctt acttgtaa                                     318

```

35

```

<210> SEQ ID NO: 53
<211> Comprimento: 363
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Oryza sativa

```

40

```

<400> Sequência: 53
atggaggaac agatgttcag agagcagcaa atgcagagag gtggaaggca tcatcagcat 60
cacaccacaa gggaacaaga acaacagcag aagcagcagc agcggcgggc gctgatgaac 120
aatgcgacca acggcgggcg cgccgacggc ggcagcaggt gctacttcag cacggaggcc 180
atcctgggtgc tggcatgcgt caccgtgtcg ctgctgggtg tgccgctcat cctgccgccg 240
ctgccgccgc cgccgacgct gctgctgctg ctgccgggtg gcttgctggc gctcctgggtg 300
45 gtgctggcct tcatgcccac tgacatgagg accatggcct ctctctactt tttttgtttg 360
tga                                     363

```

50

```

<210> SEQ ID NO: 54
<211> Comprimento: 291
<212> Tipo: DNA
<213> Organismo: Glycine max

```

55

```

<400> Sequência: 54
atgatgatgg tgcctcctcg tgatcaagta ggtggagaga cacacaagaa tttggtggag 60

```

```

ccaaacgtgg cagcttctaa gaaagctaga aattgtgcat gcatggtaag ttactcgggtg 120
ttgatttttg ctcttctcac tttgtccatt ttgttgctac ctttgggtgtt acctcctctg 180
ccgccaccac ccttggttgc tctctttgtt ccagttttca tcttgggtggt tctctttttc 240
ttggcctttt caccctccac actaccaaac atggctgttc ttacatcatg a 291

```

5

<210> SEQ ID NO: 55

<211> Comprimento: 291

<212> Tipo: DNA

10 <213> Organismo: Glycine max

<400> Sequência: 55

```

atgatgatgg tgcattcctcg tgatcaagta ggtggagaca cacacaagaa tttgggtggcg 60
ccaaacgtgg cagcttctaa gaaagctaga aattgtgcat gcatggtaag ttattcgggtg 120
15 ttgatttttg ctcttctgac tttgttcatt ttgttgctgc ctttgggtgtt gcctcctctg 180
ccggcaccac ccttggttgc tctctttgtt cctgttttcc tcttgggtggt tctctttttc 240
ttggcctttt caccctccac actaccaaac atggctgttc ttacatcatg a 291

```

20

<210> SEQ ID NO: 56

<211> Comprimento: 312

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Glycine max

25 <400> Sequência: 56

```

atggcgcggt gttttgggtt aggttccggt ctggttctgg cggcgctcgc ggcgtcgatg 60
gtggttctgc cgctgatgct gccgccgctc ccgccgccgc cactagtctt tctcttcttc 120
cccgtcggga tcatggcggc gtcattgttg ctgcggttct cgccatcaga tcaaaacggc 180
gtcgtttacg cgtcgacgta gcgaagggtg tgggaaaccg gatcagccgg tgccacattt 240
30 tgggggtttt tgaagggttc gatgggattg cttcgtttca tggttttttt tttttttaag 300
ttacggtggt aa 312

```

35 <210> SEQ ID NO: 57

<211> Comprimento: 201

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Glycine max

<400> Sequência: 57

```

atggcgcggt gtttcgggctt aggttccggt ctggttctgg cggcgctcgc ggcgtcgatg 60
gtggtgctgc cgttgatgct cccgccgctc ccgccgccgc cgctgggttt ttttttttc 120
cccgtcggga tcatggcggc gtcattgttg cttgtgttct cgccgtcgga tcaaaacggc 180
gtcgtttacg ccaccacgta a 201

```

45

<210> SEQ ID NO: 58

<211> Comprimento: 273

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Glycine max

50

<400> Sequência: 58

```

atgagctctt ggttgattca ctacaacaag agattcataa taagcatctc attagcggtt 60
atgctaaggc tttttgggtt taaatcaacc atgttcatgg tgggtgctgac catagcaatc 120
ttggttctac cactgatgct accacctcta cctccaccac caatgattct tatgttggtg 180
55 cctcttgtga taatgctgct tctggtgaaa ttggctttgt attccaaaca tggccctgca 240

```

gatgtcattt atcagtgtaa ttttacttgg tag

273

<210> SEQ ID NO: 59

5 <211> Comprimento: 393

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 59

10 atgattcgag aaatctcaaa cttacaaaaa gatattataa acattcaaga cagttattcg 60
 aacaaccgag tcatggacgt cggaagaaac aaccggaaaa acatgagctt tcgaagtctg 120
 ccggagaaaa gcaagcaaga gttacggcgg agtttctcgg cgcagaaaag gatgatgac 180
 ccggcgaatt atttcagttt agagtctctg ttcctattgg ttgggtctaac ggcattctctg 240
 ttaatacttc cgtagtttt gccgccgcta cctccgcctc cgtttatgct gctattgggt 300
 15 cccattggga ttatggtttt actcgtcgtt cttgccttca tgccttcttc tcattctaata 360
 gctaatacag atgtaacttg caatttcattg taa 393

20 <210> SEQ ID NO: 60

<211> Comprimento: 408

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 60

25 atgattcgtg agttctccag tctacaaaac gacatcataa acattcaaga acattattct 60
 ctcaacaaca acatggacgt gagaggagat cataaccgga aaaacacgag ttttcgtgg 120
 tcagctccag ctccgattat ggggaagcaa gaattgtttc ggacattgtc gtcgcagaac 180
 agtccaagga ggctaataatc agcgagttac ttcagtttag aatcaatggg tgtgcttggt 240
 ggtctcacag catctctctt gatcttaccg ttgattcttc caccattgcc tctcctcct 300
 30 tttatgctgc ttttgattcc tattgggatt atggttttgc ttatggttct tgctttcatg 360
 ccttcttcta attccaaca tgtttcttct tcttccactt ttatgtaa 408

35 <210> SEQ ID NO: 61

<211> Comprimento: 267

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Arabidopsis thaliana

<400> Sequência: 61

40 atgagggttc atgatcaacg gctgagattt gatgtcacac ccaagccgat gggtttgaac 60
 ggaagttctt tgatcacggc aagatccgtc gcacttcttc tctttctctc tctgcttctt 120
 ctgattctgc caccgttctt gccgccgctt ccaccgcctc cggcgacact cctcctcctt 180
 cctctactcc tcatgattct cctcattttc ttggcttttt ctccttctaa tgagcccagc 240
 ctcgccgttg aacctctcga cccctga 267

45 <210> SEQ ID NO: 62

<211> Comprimento: 441

<212> Tipo: DNA

50 <213> Organismo: Sorghum bicolor

<400> Sequência: 62

atgagcaccg gccggccgga ggacatccag cagctaatac acagtgccac tagtagcccc 60
 aaccgcaacta gtccatccgc ctgcgccagc gacatggaga gcggcggcgg aagcgcgtcc 120
 55 tcgccgcgcg cttcgacgtc cgaccggcgc ctgcagaggg ccgccacag tcacaggag 180

gagtgggagc ctgctgctgc tgctagcggc gatggcggca cgggtagcct ctggtccagg 240
 tacttctcgc tcccggtcct cctgctcgtc ggcgtcaccg cgctcgtggt gatcctcccg 300
 ctctgtctcc ccccgctacc gccgcgcgcg tcgatgctga tgctgggtccc ggtggcaatg 360
 ctggtcttgc tgctcgtgct ggcgttcatg ccgacgtcga gcgtccgcgc tgggacgggg 420
 5 acggggccga cctacatgta g 441

<210> SEQ ID NO: 63
 <211> Comprimento: 267
 10 <212> Tipo: DNA
 <213> Organismo: Sorghum bicolor

<400> Sequência: 63
 15 aatgccgtga agcggcacct gcagcagcgg cagcaggagg cggatttcca cgacaagaag 60
 gtcacgcgt ccacctaact cagcatcggc gcgttcctgg tgctcgctg cctcaccttc 120
 tcgctgctca tcctgcctct ggtgctgccg ccgctgccgc cgccgcgcgc gctgctgctg 180
 tggctgccgg tctgcctgct cgtcctgctg gttgtgctgg ccttcatgcc gacagatgtg 240
 cgcagcatgg cctcctctta cttgtaa 267

<210> SEQ ID NO: 64
 <211> Comprimento: 324
 <212> Tipo: DNA
 25 <213> Organismo: Sorghum bicolor

<400> Sequência: 64
 atggcaagcc gatctagcgc gctggaagga gggggggcag caatacagcg gaggaataat 60
 gccgtgaagc ggcacctgca gcagcggcag caggaggcgg atttccacga caagaaggtc 120
 atcgcgtcca cctacttcag catcggcgcg ttcttggtgc tcgcctgcct caccttctcg 180
 30 ctgctcatcc tgccgctggt gctgccgcgc ctgccgcgc cgccgtcgct gctgctgtgg 240
 ctgccggtct gcctgctcgt cctgctggtt gtgctggcct tcatgccgac agatgtgcgc 300
 agcgtggcgg cctcttactt gtaa 324

<210> SEQ ID NO: 65
 <211> Comprimento: 177
 <212> Tipo: DNA
 35 <213> Organismo: Sorghum bicolor

<400> Sequência: 65
 atgatgttgc tgggtggcgac agtgatcctc ctgtgcctgc cattggtgct gccaccactt 60
 ccgccaccac cgctgttcct tctcttcgtc cctgtggtga tgatgctcct gctcttctcc 120
 ctggttctct tcccgtctca cactgtgca tgctcttctc caaccttcac tcagtaa 177

<210> SEQ ID NO: 66
 <211> Comprimento: 447
 <212> Tipo: DNA
 45 <213> Organismo: Sorghum bicolor

<400> Sequência: 66
 atgagctttg tggccggcag ctctgaggct gatcaactct gggttcttgat cccgtcggaa 60
 caagcacgag ctacgcgggt acagcctcat catccgttgg ccatggaccg gaggtcgtcg 120
 gcgaggagga gaggcgatcc tcacctcac cgccggggcg caatgcacgg tgccgcgcgag 180
 55 cagcagaagc agcagcagca gcgcggccgg ccgcagggaa cgcgggcggc gccgcccgtg 240

```

ccgccgggct acttcacggc ggagctggtg ctggcggttc tgttcgtggc cgtgtcgtg 300
gcgttcctcc cgctggctct gccgcgctg tcgccgccgc cgttcctgct gctgctggtg 360
cccgtgggac tgctggccgt gtcctcgcg ctgcgcgttc tgccgctcga cgcgcacaga 420
cacctcgtcg tcggctcctc ccgctga 447

```

5

<210> SEQ ID NO: 67

<211> Comprimento: 363

<212> Tipo: DNA

10 <213> Organismo: Sorghum bicolor

<400> Sequência: 67

```

atggcggagg agaggaagca ggccgggtcc cgctggcccc ccggaggcag cggcggcggg 60
cgaatgcgcg acgccgaggg tggcagtggc aagatgcggg gccggcaggc aacaaaggca 120
15 aggcccgtag tactggcgcc gccgggccag gggacttca cggcggggct ggccggcgct 180
ttcctctgcc tcaccgcgct gctggtgttc ctgccgctcg tgctgcccc gctgccgccg 240
ccgccgtatc ttctgctgct cgtgccgggt ggccctcatg ccgtactgct ggctctggtg 300
gcgctcgtgc cgtccgacgg ccggggccgc accgccgccg tcgcgtcgtc gtgcgtgtgc 360
20 tga 363

```

<210> SEQ ID NO: 68

<211> Comprimento: 306

<212> Tipo: DNA

25 <213> Organismo: Sorghum bicolor

<400> Sequência: 68

```

atgcggcggg cgggtgccga ggaggaagcc gtggcgggcg cgacgacgac gaccatggac 60
gggggcaagg tgggtggcgt gctggccacg gcggccgcgc tgctgctgct cctcccgtg 120
30 gcgctgcccc cgctgccgcc gccgccacg cagctgctgt tcgtcccgt cgtcatgctg 180
ctgctcgtgg cgtccctcgc cttctgcccc accgccgcga gcagcgggcg cggcggcaag 240
agcaagctcg ccgacgccga ccacgggtcg tcgtttcgga ctactggatc accgcacctg 300
cgctga 306

```

35

<210> SEQ ID NO: 69

<211> Comprimento: 321

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Sorghum bicolor

40

<400> Sequência: 69

```

atgccgtcgc cgtcgcagac atgccgcgcg gtcgggaggc ggactgctca tggcggctgg 60
cacaagcacg atgacccaag cacgccgagg ggcttctgca ccaagtactt ctccgtggag 120
tcgtgcctcc tgctcgccct cgtcgccgtg ctgctgctgg tgctcccgt cgtcctgccg 180
45 ccgtccccgc cgccgccgtt ggccgtgctg ctgctgccgg tcgcaatgtt ggccgtgctg 240
ctggtgctgg cgctcatgcc ggtggcggcg gcggcgggcg gtgcccggaa cgaggctcgtg 300
gacccggcgt cgtacttgta g 321

```

50 <210> SEQ ID NO: 70

<211> Comprimento: 219

<212> Tipo: DNA

<213> Organismo: Sorghum bicolor

55 <400> Sequência: 70

```

atggaacgaa gcatggtgac gatgctgctc ctccgcgacgg cggccgtggt gcttctgctg 60
ctcccgtgc tgctcccttc ttccctgccg ccaccgccgt cgctgctgct ggtcgtccct 120
gtcgtgctgc tgctctcgct gctttccctc gctttccctc ccaccgcga cgacgatgac 180
gctattgcta tctacggatc actccgatcc gtgcagtga 219

```

5

<210> SEQ ID NO: 71

<211> Comprimento: 2436

<212> Tipo: DNA

10 <213> Organismo: Zea mays

<400> Sequência: 71

```

aacaattcct gctacatgac ataaaaataa taaatggctg actgacttgt tacactgaca 60
gaaataacat ccaagtctcc caatccaatt ccccttaatg aagtttagctt ttgttagcaa 120
15 ggcccatctt ctatgagcca cataaagaac ttgatttttg gtgggttttt ttctttacaa 180
atgtgtttta aatgtaaacc ggtttcattt ctagtaaggt attgtataca gatttgacag 240
aaaatcttcc atttttccta gatttccaga taatgctttc tggactgtca ttaagatgga 300
acgacaccac ttgttcctaa atcttatccc acatatatat acttgaggtc atccactaat 360
aattagattt ttggcacact tactttcttc tggttacata attaataagg gcctgttttag 420
20 ataccaggag ctaaagaaaa agtgggttaa gtttagtcaa tttagggggt taaagatcta 480
aaccggaaga atgagtgact aaaataataa aagtgtaccc ttttagtcac ttttagctcc 540
taagaagaag ctaaccttta atcagtttgc ttttaacccc tggatccaaa caagtcctaa 600
atcaccggta taactaggca caatgcctca tcagacagcc aactgccaat cccaaattct 660
actttgttgt ccatttctaa ttttaatgcc tctgcctgca cgtatactat ttttgttttt 720
25 gattaagtca taccacatag gagaatcact caatttatta gtaattgtat tgtatgaact 780
gaatcatttg gcgtatat ttggctttctt aagcacaggc acactgctac caaaagcatt 840
aggcgcttaa gcatcaccct tgtggctggc acgagaacca tttgattcac gacagattta 900
gcgcttggtt gaagtgttgg ctaaaactag caatctacag ggaagaacac catacattag 960
30 tactccgtcg ggacacgcca ccacatgccg ctgaaatata tccgcaacga ttctcccagc 1020
tgcttatagc tcagaagcaa gagccaaggc cggcagctaa ccacgactcg tctaatac 1080
cctggaccat agcgattaat aaattgatta agctagtaca tcgcccctag atttccggca 1140
gaattaagaa aaccgcgggc agcagagccg atgccgatgg caacaaagaa gaaggggctg 1200
ttggtagctg agccgcagtc tataaagata aaaattgtag aagtagtagg aagcttagcc 1260
35 ggagctggca tggcaggctg ctgctgagtg agcagcgggt ggggcctcct ggctggcgcg 1320
tggaanaacc cgagcaaatg gcagcgtgaa gcacgtccga gactgagggtc aggcgctcggg 1380
cgggggttgc ggccagggga gacgaatgaa cccctgcccc cgcctggatc ccatcgcaaa 1440
agccccctcc cctctccgc cttcgcgcac attatattcg cgcaccatcg cagcaacttg 1500
cacgggcgcc gatgactagt tgcgccagat gcactgcac tgctcggcgt ggtgcctcca 1560
acgtccaacc cctcttctc ttgtctctcg tctacctctc ttctgcccct ctgcgtccgt 1620
40 gtctccatcg tcgtcgctgc gtgaggttga cgacgaccag tcacaggacc tgttcgttcc 1680
tcatgcgacc cagctagcta aaactggcat gcatggacat gctacgctgc tgcgtcaatc 1740
catctacca ggtacgctgc tgtacatgct gctacgagcc tacgatcgat agcagtctgt 1800
gccttccctt gctcgatgcc gatgtttatc tgcattgtgat cgtattcgta tgcacggccc 1860
tccgccctct caagctgagt gcttttttgt gggcccatcg tcctatatac gctcatcagt 1920
45 tcaactgacga cgatataacg actgttgggg ttcaaaaact acatattgtg gtgctcgccc 1980
gatctctttc ttgtatat ttcttattat tagtctctct ctctctgaaa gaacaaggaa 2040
ctagatgtct tgttttgtgc ctctactat acctttgcgt gtttttcttg cttttgtcca 2100
tggcttttca ccggtctgct ggggtgaagta atttacacgc atgtcttacg cacgcgctcc 2160
ttcagttgtc cgcatactcg atcataacat cgcttcattc atgtgctgac gagatatttt 2220
50 tcgccgccga gactgcagtg ctagctagct agatctggcc tgattcgccg atcgagcggt 2280
ggtagagacg agtgcttcag ctcaaagact gctagtggta ggctggtagc tagctgtgtg 2340
cctgtgtgca gtgtgactg ccactgcatg cgcggcgcc tggacttaag acggcagcac 2400
acgcacgcga ggaggcgctg gctgaagcga gcgctc 2436

```

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleotídeo isolado, caracterizado pelo fato de que é isolado do grupo consistido de:

- 5 a. um polinucleotídeo que apresenta pelo menos 70% de identidade de sequência, como determinado pelo algoritmo GAP sob condição de parâmetros padrão, em relação a sequência completa de um polinucleotídeo selecionado a partir de um grupo consistindo de SEQ ID NOS:1, 3, 5 e 40-71; aonde o polinucleotídeo codifica um polipeptídeo que funciona como um modificador de tamanho de órgão;
- 10 b. um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo selecionado a partir do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 2, 4 e 6-37; e
- 15 c. um polinucleotídeo selecionado a partir do grupo consistindo de SEQ ID NOS: 1, 3, 5 e 40-71; e
- d. Um polinucleotídeo que é complementar ao polinucleotídeo de (a), (b) ou (c).

20

2. Cassete de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, em que o polinucleotídeo está operacionalmente ligado, na orientação sense ou antisense, a um promotor.

25

3. Célula hospedeira, caracterizada por compreender o cassete de expressão de acordo com a reivindicação 2.

4. Planta transgênica, caracterizada pelo fato de que compreende o cassete de expressão de acordo com a reivindicação 2.

5 5. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a referida planta é uma monocotiledônea.

10 6. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a referida planta é uma dicotiledônea.

15 7. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a referida planta é selecionada a partir de um grupo consistindo de: milho, soja, girassol, sorgo, canola, trigo, alfafa, algodão, arroz, cevada, milheto, amendoim e cacau.

20 8. Semente transgênica, caracterizada pelo fato de que é produzida pela planta de acordo com a reivindicação 4.

9. Método para modular o tamanho de órgãos em plantas, caracterizado pelo fato de que compreende:

25 a. introduzir em uma célula vegetal, um cassete de expressão que compreende o polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1 operacionalmente ligado a um promotor; e

- b. cultivar a planta sob condições de crescimento em cultura celular vegetal; aonde o tamanho do órgão da referida célula vegetal é modulado.

5 10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a célula vegetal é proveniente de uma planta selecionada a partir do grupo consistindo de: milho, soja, girassol, sorgo, canola, trigo, alfafa, algodão, arroz, cevada, milheto, amendoim e cacau.

10

11. Método de modular toda a planta ou o tamanho de órgão em uma planta, caracterizado pelo fato de que compreende:

15

- a. introduzir em uma célula vegetal, um cassete de expressão recombinante que compreende o polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1 operacionalmente ligado a um promotor; e

20

- b. cultivar a célula vegetal sob condições de crescimento em cultura celular vegetal; e
- c. regenerar uma planta a partir da referida célula vegetal, aonde o tamanho do órgão na referida planta é modulado.

25

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a planta é selecionada a partir do grupo consistindo de: milho, soja, sorgo, canola, trigo, alfafa, algodão, arroz, cevada, milheto, amendoim e cacau.

13. Produto, caracterizado pelo fato de que é derivado do método de processamento de tecidos vegetais transgênicos expressando um polinucleotídeo isolado que codifica um gene ARGOS, o método compreende:

5

a. transformar uma célula vegetal com um cassete de expressão recombinante que compreende um polinucleotídeo apresentando pelo menos 90% de identidade de sequência com a sequência completa de um polinucleotídeo selecionado do grupo consistindo de SEQ ID NOS:1, 3, 5 e 40-71, operacionalmente ligado a um promotor; e

10

b. cultivar a célula vegetal sob condições de crescimento em cultura celular vegetal; aonde o crescimento na referida célula vegetal transformada é modulado;

15

c. crescer a célula vegetal sob condições de formação de planta para expressar o polinucleotídeo no tecido vegetal; e

20

d. processar o tecido vegetal para obter um produto.

14. Produto de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de o polinucleotídeo codifica ainda um polipeptídeo selecionado a partir do grupo consistindo de SEQ ID NO: 2, 4 e 6-37.

25

15. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a planta é uma monocotiledônea.

16. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a planta é selecionada a partir do grupo consistindo de: milho, soja, girassol, sorgo, canola, trigo, alfafa, algodão, arroz, cevada e
5 milheto.

17. Produto de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que aumenta a resistência do caule de uma planta pela super expressão do
10 polinucleotídeo.

18. Produto de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que aumenta o rendimento através do incremento da biomassa.
15

19. Produto de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que é um constituinte de etanol.

FIGURA 1

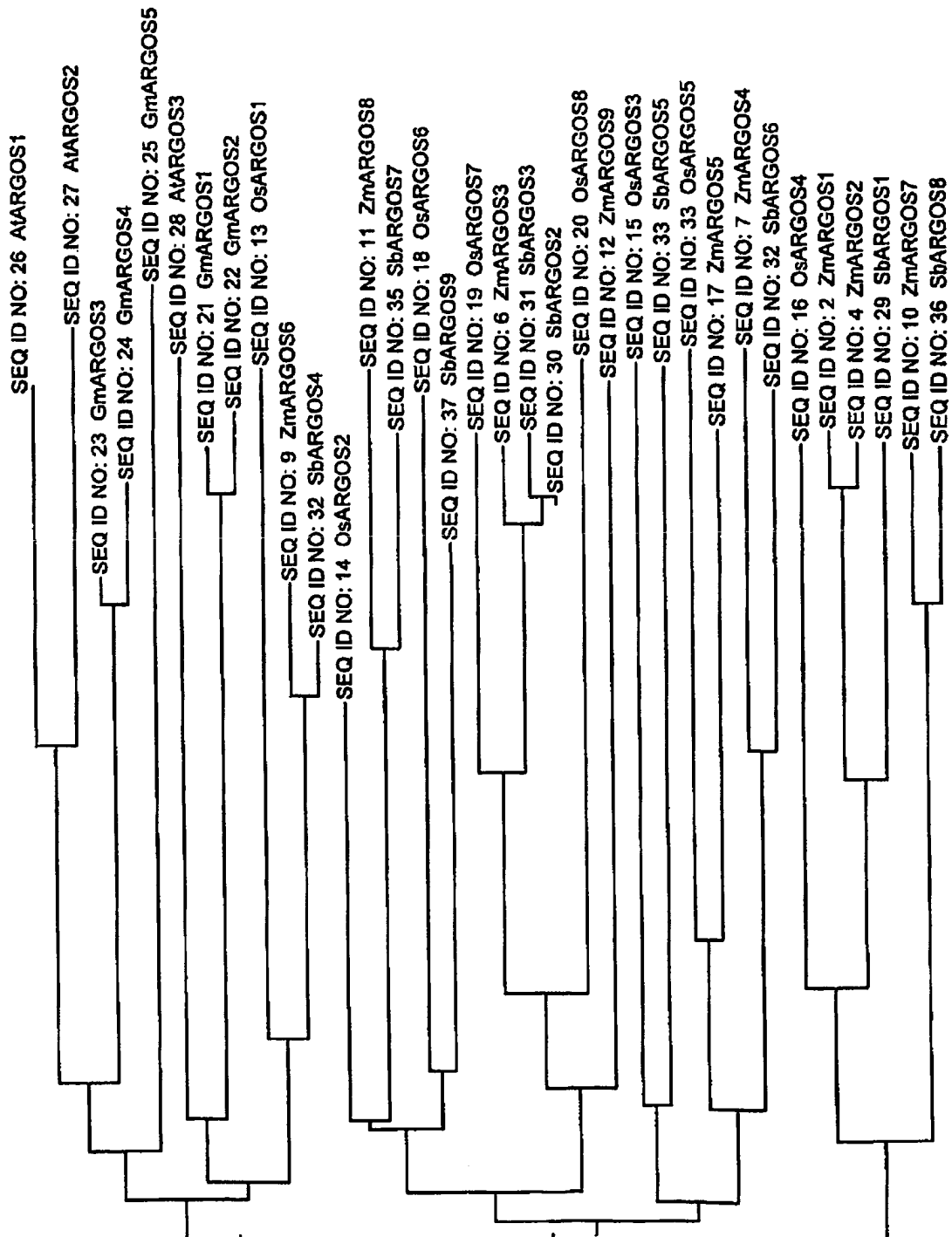


FIGURA 2^a

AtARGOS_1A	SEQ ID NO: 26 (32-147)	(1)	1	50	-----MDVG-RNNRKNMSFR--
AtARGOS_1B	SEQ ID NO: 26	(1)			-----MIREISNLQKDIINIQDSYNNRVMDVG--RNNRKNMSFR--
AtARGOS_2	SEQ ID NO: 27	(1)			-----MIREFSSIQNDIINIQEHYSLNNNMVDRGDHNRKNTSFRGS
AtARGOS_3	SEQ ID NO: 28	(1)			-----MRVH
OsARGOS_1	SEQ ID NO: 13	(1)			-----MKTTLAVVEGTRAHIVNLANSRASRLN
OsARGOS_2	SEQ ID NO: 14	(1)			-----
OsARGOS_3	SEQ ID NO: 15	(1)			-----MSFAIRSSEPEFWFLIPSEEA VAAHRLVVDQRRSGSAYRP
OsARGOS_4	SEQ ID NO: 16	(1)			-----MEKGR-----GKACGGSTAPPPPPSS
OsARGOS_5	SEQ ID NO: 17	(1)			-----MRGVILLRYEEDAMAGHRSTAAATGG-----RLYGQGVK
OsARGOS_6	SEQ ID NO: 18	(1)			-----
OsARGOS_7	SEQ ID NO: 19	(1)			-----MEGVGARQRNPLIPR
OsARGOS_8	SEQ ID NO: 20	(1)			-----MEEQMFREQQMQRGRHHQHTTREQ
ZmARGOS_1	SEQ ID NO: 2	(1)			-----MSTRPEDTQQLINSAASPNRSAPSAPSD
ZmARGOS_2	SEQ ID NO: 4	(1)			-----MSAGPEDTQQLINSAASPNRSAPSAPSD
ZmARGOS_3	SEQ ID NO: 6	(1)			-----MASRSSAMEGGAAIQRR-----
ZmARGOS_4	SEQ ID NO: 7	(1)			-----MCRGLTPAPALQFQSDCSRQRTTQAPPGRASESVRACMAAER
ZmARGOS_5	SEQ ID NO: 8	(1)			-----MHLDDLQRDRGGAATG-----SRSRKPPPP
ZmARGOS_6	SEQ ID NO: 9	(1)			-----
ZmARGOS_7	SEQ ID NO: 10	(1)			-----MPSSQTTPPPVGR
ZmARGOS_8	SEQ ID NO: 11	(1)			-----MMLHCTFAISEAP
ZmARGOS_9	SEQ ID NO: 12	(1)			-----MPVASSLMAMELETDLAWAEQQQRNRQTMMV
GmARGOS_1	SEQ ID NO: 21	(1)			-----MMMVH
GmARGOS_2	SEQ ID NO: 22	(1)			-----
GmARGOS_3	SEQ ID NO: 23	(1)			-----
GmARGOS_4	SEQ ID NO: 24	(1)			-----
GmARGOS_5	SEQ ID NO: 25	(1)			-----
SbARGOS_1	SEQ ID NO: 29	(1)			-----MSTGRPEDIQQLINSAATSPNRTSPSAPSD
SbARGOS_3	SEQ ID NO: 30	(1)			-----MASRSSALEGGAAIQRR-----
SbARGOS_2	SEQ ID NO: 31	(1)			-----
SbARGOS_4	SEQ ID NO: 32	(1)			-----
SbARGOS_5	SEQ ID NO: 33	(1)			-----MSFVAGSSEADQLWFLIPSEQARAHAVQPHPLAMDRSSARRRGDPHPH
SbARGOS_6	SEQ ID NO: 34	(1)			-----MAERKQAGSRWPAGG-----SGGGRMDA
SbARGOS_7	SEQ ID NO: 35	(1)			-----
SbARGOS_8	SEQ ID NO: 36	(1)			-----MPSPSQTSPV-VGRR
SbARGOS_9	SEQ ID NO: 37	(1)			-----
Consensus				(1)	-----

FIGURA 2B

AtARGOS_1A_pep	(15)	51	--SSPEKSKQELRRSFSAQK-----	100	-----RMMIPAN
AtARGOS_1B_pep	(39)		--SSPEKSKQELRRSFSAQK-----		-----RMMIPAN
AtARGOS_2_pep	(42)		APAPIMGKQELFRTLSSQNSP-----		-----RRLISAS
AtARGOS_3_pep	(5)		DQRLRFDTVTPKPMGLN-----		-----GSS
OsARGOS_1_pep	(28)		ERLIDPAIESRSIAGATPAP-----		-----F
OsARGOS_2_pep	(1)		-----		-----
OsARGOS_3_pep	(45)		KRTHMAAAEDEHRRPGTSSRR-----		-----VAPTPTTQTQTATPG
OsARGOS_4_pep	(24)		SGKSGGGGGSNIREAAS-----		-----GGGGGVWGK
OsARGOS_5_pep	(36)		RRVVEETAAAVEVGGGG-----		-----
OsARGOS_6_pep	(1)		-----MQEEAASS-----		-----SSSSASPVN
OsARGOS_7_pep	(17)		PNGSKRHLOH--QHQPNA-----		-----EKKTAATSN
OsARGOS_8_pep	(27)		EQQKQQRRLMNNATNG-----		-----GGDGGSRC
ZmARGOS_1_pep	(32)		MERGSCTAASSSRASSTTSHSHQATHRVVEEEEEEPSSSRGG-GSLCSG		
ZmARGOS_2_pep	(31)		MERGSCTAASSSRASSTTSHSHQATHRVVEEEEEEPSSSRGG-GSLCSG		
ZmARGOS_3_pep	(18)		--NAVKRHLQ--RQEADF-----		-----LDDKVIASST
ZmARGOS_4_pep	(49)		KAAASRPACGRMRGAEGAKPRGRQAK-----		-----AARAPPGQG
ZmARGOS_5_pep	(29)		LAAAAAAGVPAGSSTAATA-----		-----T
ZmARGOS_6_pep	(1)		-----		-----
ZmARGOS_7_pep	(16)		AAHGGRHKHDDDDDPSTPR-----		-----GFCAK
ZmARGOS_8_pep	(14)		ARALALGVSVMRMPQE-----		-----EEAAVATT
ZmARGOS_9_pep	(35)		CRKSDAAVAKGQQQRNASP-----		-----PSPKPPPPAG
GmARGOS_1_pep	(6)		PRDQVGGETHKNLVNPVNAAS-----		-----KKARNCA
GmARGOS_2_pep	(6)		PRDQVGGETHKNLVNPVNAAS-----		-----KKARNCA
GmARGOS_3_pep	(1)		-----		-----MAR
GmARGOS_4_pep	(1)		-----		-----MAR
GmARGOS_5_pep	(1)		--MSSWLIHYNKRFTTISIS-----		-----LAFMLR
SbARGOS_1_pep	(32)		MESG-GGSASSPRASSTDRRLQRAAHSREWEPEAAAAASGDGGSLSWSR		
SbARGOS_3_pep	(19)		NNAVKRHLQ--RQEADF-----		-----HDKKVIASST
SbARGOS_2_pep	(1)		--NAVKRHLQ--RQEADF-----		-----HDKKVIASST
SbARGOS_4_pep	(1)		-----		-----
SbARGOS_5_pep	(51)		RGAMHGAAEQKQQQQRGRPQ-----		-----GTRAAAPPVPPG
SbARGOS_6_pep	(26)		EGGS-----GKMRGRQATKAR--P-----		-----VVLAPPQGQ
SbARGOS_7_pep	(1)		-----MRAVPQEE-----		-----AVAAATTTT
SbARGOS_8_pep	(15)		TAHGGWHKHDD--PSTPR-----		-----GFCTK
SbARGOS_9_pep	(1)		-----		-----M
Consensus	(51)		-----		-----

FIGURA 2C

AtARGOS_1A_pep	(40)	YFSLESFLLVCTASUILLVLPVLPPLPP-PPFMLLLVPTIGIMVLLVLA	150
AtARGOS_1B_pep	(64)	YFSLESFLLVCTASUILLVLPVLPPLPP-PPFMLLLVPTIGIMVLLVLA	
AtARGOS_2_pep	(70)	YFSLESFLLVCTASUILLVLPVLPPLPP-PPFMLLLVPTIGIMVLLVLA	
AtARGOS_3_pep	(24)	LIGARSVALLEFLLSLLVLPVLPPLPP-PPATLLLPILLMILLVLA	
OsARGOS_1_pep	(49)	EMETAMVLLLAFAVALLCYELVLPVLPPLPPPALFVFWVFMILLFALA	
OsARGOS_2_pep	(1)	-----MVMILLAAAVLLDDELLVLPPLPPP-SLLLLVFWVLLALVLA	
OsARGOS_3_pep	(83)	YFVELVMAFVCTASUILLVLPVLPPLPP-PPSLLLVFWVLLALVLA	
OsARGOS_4_pep	(51)	YFVESILLVCTASUILLVLPVLPPLPP-SMMLVFWVLLALVLA	
OsARGOS_5_pep	(55)	YLGVEFAVLLGVCTASUILLVLPVLPPLPP-PPMMLLVFWVLLALVLA	
OsARGOS_6_pep	(18)	DGGRAMVLLAAAVLLVLPVLP-----SLLLLVFWVLLALVLA	
OsARGOS_7_pep	(43)	YFSIEFVLLVFWVCTASUILLVLPVLPPLPPP-SLLLLVFWVLLALVLA	
OsARGOS_8_pep	(55)	YFSTEFAVLLVCTASUILLVLPVLPPLPPP-TLLLLVFWVLLALVLA	
ZmARGOS_1_pep	(81)	YLSLP-ALLLVGVCTASUILLVLPVLPPLPPP-SMMLVFWVLLALVLA	
ZmARGOS_2_pep	(79)	YLSLP-ALLLVGVCTASUILLVLPVLPPLPPP-SMMLVFWVLLALVLA	
ZmARGOS_3_pep	(43)	YFSIGAFVLLVCTASUILLVLPVLPPLPPP-SLLLVFWVLLALVLA	
ZmARGOS_4_pep	(84)	YFAGLAALFLCTTLLVFWVCTASUILLVLPVLPPLPPP-SLLLVFWVLLALVLA	
ZmARGOS_5_pep	(51)	HLGPEFAVLLVCTASUILLVLPVLPPLPPP-PPPLLLVFWVLLALVLA	
ZmARGOS_6_pep	(1)	-MSKRVLMMLAAVLLVLPVLPPLPPP-PPPLLLVFWVLLALVLA	
ZmARGOS_7_pep	(39)	YFSRESCLLIATVLLVLPVLPVLPPLAPP-LALLLVFWVLLALVLA	
ZmARGOS_8_pep	(41)	MAGGKVAALLATAAALLVLPVLPPLPPP-TOLLVFWVLLALVLA	
ZmARGOS_9_pep	(63)	GLSAEAFVLLVCTASUILLVLPVLPPLPPP-PLLLLVFWVLLALVLA	
GmARGOS_1_pep	(34)	CMVSYSVLLVCTASUILLVLPVLPPLPP-PPPLLLVFWVLLALVLA	
GmARGOS_2_pep	(34)	CMVSYSVLLVCTASUILLVLPVLPPLPA-PPPLLLVFWVLLALVLA	
GmARGOS_3_pep	(4)	CFGLGSVLLVCTASUILLVLPVLPPLPP-PPPLLLVFWVLLALVLA	
GmARGOS_4_pep	(4)	CFGLGSVLLVCTASUILLVLPVLPPLPP-PPPLVFFFWVLLALVLA	
GmARGOS_5_pep	(24)	LFGEKSTVFWVLLVCTASUILLVLPVLPPLPP-PPMMLVFWVLLALVLA	
SbARGOS_1_pep	(81)	YFSLP-ALLLVGVCTASUILLVLPVLPPLPPP-SMMLVFWVLLALVLA	
SbARGOS_3_pep	(45)	YFSIGAFVLLVCTASUILLVLPVLPPLPPP-SLLLVFWVLLALVLA	
SbARGOS_2_pep	(26)	YFSIGAFVLLVCTASUILLVLPVLPPLPPP-SLLLVFWVLLALVLA	
SbARGOS_4_pep	(1)	-----MMLLVATVLLVCTASUILLVLPVLPPLPP-PPPLVFWVLLALVLA	
SbARGOS_5_pep	(84)	YFPAELVLLVCTASUILLVLPVLPPLSP-PPFLLLVFWVLLALVLA	
SbARGOS_6_pep	(52)	YFPAELVLLVCTASUILLVLPVLPPLPP-PPYLLLVFWVLLALVLA	
SbARGOS_7_pep	(19)	MDGGKVAALLATAAALLVLPVLPPLPPP-TOLLVFWVLLALVLA	
SbARGOS_8_pep	(36)	YFSVESCLLIATVLLVLPVLPPLPPP-LALLVFWVLLALVLA	
SbARGOS_9_pep	(2)	ERSMVTMMLLAATAAVLLVLPVLPSSLPPLPPSLLVFWVLLALVLA	
Consensus	(101)	YFS SVLLLA LT SLLLVLPVLPPLPP PP LLLLVFW LLLLL LA	

FIGURA 2D

AtARGOS_1A_pep	151	(89)	FMPS	SHSNANTDVT	CNFM	196
AtARGOS_1B_pep		(113)	FMPS	SHSNANTDVT	CNFM	
AtARGOS_2_pep		(119)	FMPS	NS-KHVSSS	TEM	
AtARGOS_3_pep		(73)	FSPS	NEPSLA	VEPLDP	
OsARGOS_1_pep		(99)	LEPVQ			
OsARGOS_2_pep		(46)	FLPNR	VVVGQQPA	DQFFFRQ	
OsARGOS_3_pep		(132)	FVPLD	AQSNVVGSSCL		
OsARGOS_4_pep		(100)	EMPT	TTSSSSAGGGGG	GRNGA	TTGHAPYL
OsARGOS_5_pep		(103)	VLLP	SDAKSIAAAGR	SSSSSYL	
OsARGOS_6_pep		(61)	FEP	AGSDGVVAAA	VAGTYQPPPP	PARSSPPSSSSSRQL
OsARGOS_7_pep		(92)	-FMP	TDVRSMASSYL		
OsARGOS_8_pep		(104)	-FMP	DMRTMASSY	FFCL	
ZmARGOS_1_pep		(129)	FMP	STG	GRGGTG	PTYM
ZmARGOS_2_pep		(127)	FMP	STG	GRGGTG	PTYM
ZmARGOS_3_pep		(92)	-FMP	TDVRSMASSYL		
ZmARGOS_4_pep		(132)	ALVP	SDGRAAAA	AVASSCVC	
ZmARGOS_5_pep		(99)	VLLP	SDARA	AVAT--P--TSSASYL	
ZmARGOS_6_pep		(49)	FFPS	NHCP	CSPTFTQ	
ZmARGOS_7_pep		(88)	LMP	--AAAGR	NEAVDP	ASYL
ZmARGOS_8_pep		(90)	FCPA	ATSS--PSP	MHADHG	SFGTGSPLHC
ZmARGOS_9_pep		(112)	TFVP	TDVRSMP	SSNL	
GmARGOS_1_pep		(83)	FSPS	LLPNMAV	LTS	
GmARGOS_2_pep		(83)	FSPS	LLPNMAV	LTS	
GmARGOS_3_pep		(53)	FSPS	DQNGVV	YAST	
GmARGOS_4_pep		(53)	FSPS	DQNGVV	YATT	
GmARGOS_5_pep		(73)	LYSK	HGPADVI	QCNTW	
SbARGOS_1_pep		(129)	FMP	TSVR	AGTGTG	PTYM
SbARGOS_3_pep		(94)	-FMP	TDVRSVA	ASYL	
SbARGOS_2_pep		(75)	-FMP	TDVRSMASSYL		
SbARGOS_4_pep		(43)	LFPS	HCACSS	PFTQ	
SbARGOS_5_pep		(133)	FVPLD	AHSHLV	VGSSR	
SbARGOS_6_pep		(101)	ALVP	SDGRAATA	AVASS-CVC	
SbARGOS_7_pep		(68)	FCPT	AASSGGG	GKLADHGS	SFRTTGSPLR
SbARGOS_8_pep		(85)	LMP	AAAAAGAR	NEVDP	ASYL
SbARGOS_9_pep		(52)	FLP	TRDDDDA	AIYGLRSVQ	
Consensus		(151)	F	P	S	

Figura 3

AtARGOS_1A	SEQ ID NO: 26 (32-147)	(1)	1	-----MDVGRNNRKNMSFSSPEK	50
ZmARGOS1	SEQ ID NO: 2	(1)		MSUTRPEDTQQLINSAASPNSAPSAAPSDMERGSGTAASSRASTTSH	
ZmARGOS2	SEQ ID NO: 4	(1)		-----MGRSSAMEGCAIQRNAVKR	
ZmARGOS3	SEQ ID NO: 6	(1)		-MSAGPEDTQQLINSAASPNSAPSAAPSDMERGSGTAASSRASTTSH	
	Consensus	(1)		S PEDTQQLINSAASPNSAPSAAPSDMERGSGTAASSRRSTTSH	
AtARGOS_1A	SEQ ID NO: 26 (32-147)	(20)	51	SKQ-----ELRRSFSAQKRMMPANFSLFSLFLVGLTASLLIL	100
ZmARGOS1	SEQ ID NO: 2	(51)		SHQRATHRVVVEEEEEPPSSSRGGGSCSGKLSLP-ALLVGVYASLVIL	
ZmARGOS2	SEQ ID NO: 4	(23)		HLQ-----QRQQADEFDQKVMASSTFSGFLVIACTVSLIL	
ZmARGOS3	SEQ ID NO: 6	(50)		SHQRATHRVVVEEEEE-PSSSRGAGSCSGKLSLP-ALLVGVYASLVIL	
	Consensus	(51)		SHQRATHRVVVEEEEE PSSSRGKGSICSGKLSLPAALLVGLTASLLIL	
AtARGOS_1A	SEQ ID NO: 26 (32-147)	(60)	101	PLVLPPLPPPPFMLLVPIGIMVLLVLAEMPSSSHSNANTDVTCTEM	147
ZmARGOS1	SEQ ID NO: 2	(100)		PLVLPPLPPPPSMLLVVPVAMLLLVLAEMFTSSTGGRGGTGPTYM	
ZmARGOS2	SEQ ID NO: 4	(63)		PLVLPPLPPPPSLLMLVPCLLVLLVLAEMFTDVRSMASLYL----	
ZmARGOS3	SEQ ID NO: 6	(98)		PLVLPPLPPPPSLLMLVAVAMLLLVLAEMFTSSTGGRGGTGPTYM	
	Consensus	(101)		PLVLPPLPPPPSLLLVVPVAMLLLVLAEMFTSSTGGRGGTGPTYM	

RESUMO

POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, CASSETTE DE EXPRESSÃO, MÉTODO PARA MODULAR O TAMANHO DE ÓRGÃOS EM PLANTAS, MÉTODO DE MODULAR TODA A PLANTA OU O TAMANHO DE ÓRGÃO EM UMA PLANTA, PRODUTO

5

A presente invenção fornece polinucleotídeos e peptídeos relacionados com a família do gene ZmARGOS.

10 A presente provê ainda a sequência genômica para genes ZmARGOS. ZmARGOS é responsável por controlar o crescimento da planta, o tamanho de órgãos e o rendimento em culturas agrícolas.