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

(21) **PI 0713698-6 A2**

BRPI0713698A2

(22) Data de Depósito: 13/06/2007
(43) Data da Publicação: 06/11/2012
(RPI 2183)

(51) Int.Cl.:
C12N 15/52
A01H 1/00
A01H 3/00
A01H 5/00
A01H 5/10
C07K 16/40
C12N 15/29
C12N 15/82
C12N 5/10
C12N 9/00
C12Q 1/68
G01N 33/573

(54) Título: GENE E PROTEÍNA PARA CAPACIDADE DE ADAPTAÇÃO À LIMITAÇÃO DE NITROGÊNIO E MODULAÇÃO DOS MESMOS

(30) Prioridade Unionista: 13/06/2006 US 60/812981

(73) Titular(es): University Of Guelph

(72) Inventor(es): Mingsheng Peng, Steven Rothstein, Yong-Mei Bi

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

(86) Pedido Internacional: PCT CA2007001019 de 13/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/143819de 21/12/2007

(57) Resumo: GENE E PROTEÍNA PARA CAPACIDADE DE ADAPTAÇÃO À LIMITAÇÃO DE NITROGÊNIO E MODULAÇÃO DOS MESMOS. A presente invenção refere-se a um gene de ubiquitina E3 ligase similar a RING regulado pelo nitrogênio necessário para a sensibilidade a açúcares e à modulação da expressão deste gene para modular uma característica em uma planta. A ubiquitina E3 ligase similar a RING da presente invenção está envolvida na mediação das respostas adaptativas à limitação de nitrogênio em plantas e sua expressão é influenciada pela condição de nitrogênio. A expressão aumnetada desta ou de genes substancialmente similares pdoe produzir plantas com melhor utilização de nitrogênio e maior rendimento.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"GENE E PROTEÍNA PARA CAPACIDADE DE ADAPTAÇÃO À LIMITAÇÃO DE NITROGÊNIO E MODULAÇÃO DOS MESMOS".**

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a métodos de modulação de características agronômicas em plantas através da modulação da expressão de uma ligase de ubiquitinação do Tipo RING nas células vegetais. Em particular, a presente invenção refere-se a métodos de aumento da utilização de nitrogênio em plantas. A presente invenção também se refere a moléculas de ácidos nucléicos isoladas de *Arabidopsis thaliana* que compreendem sequências de nucleotídeos que codificam proteínas que medeiam a capacidade da adaptação à limitação de nitrogênio e, em última análise, podem modular as respostas à limitação de nitrogênio incluindo a reciclagem de nitrogênio, a produção de antocianina, a mobilização de açúcar e a fotossíntese reduzida.

Antecedentes da Invenção

A melhoria das características agronômicas de plantas de cultivo está em andamento desde o início da agricultura. A maior parte da terra adequada para a produção de plantas de cultivo está sendo atualmente utilizada. Uma vez que as populações humanas continuam a crescer, variedades de plantas de cultivo melhoradas serão necessárias para fornecer adequadamente o alimento e o produto alimentício para o mundo (Trewavas (2001) Plant Physiol. 125: 174-179). Para evitar inanição e subnutrição catastróficas, os cultivares de plantas de cultivos futuros precisarão ter rendimentos maiores com insumos agrícolas equivalentes. Estes cultivares precisarão resistir mais eficientemente às condições adversas tal como seca, salinidade do solo ou doença, que serão especialmente importantes à medida que terras marginais são levadas ao cultivo. Finalmente, será desejável ter cultivares com composição de nutrientes alterada para aumentar a nutrição humana e de animais e para possibilitar um processamento eficiente de alimentos e produtos alimentícios. Para todas estas características, a identificação dos genes que controlam a expressão fenotípica das características

de interesse será crucial na aceleração do desenvolvimento de germoplasma de plantas de cultivo superiores através de meios convencionais ou transgênicos.

Um número de abordagens altamente eficientes está disponível para auxiliar a identificação de genes que desempenham funções chaves na expressão de características agronomicamente importantes. Estas incluem genética, genômica, bioinformática e genômica funcional. A genética é o estudo científico dos mecanismos de herança. Através da identificação de mutações que alteram a via ou a resposta de interesse, a genética clássica (ou passada adiante) pode ajudar a identificar os genes envolvidos nestas vias ou respostas. Por exemplo, um mutante com maior susceptibilidade à doença pode identificar um componente importante da via de transdução de sinal da planta que conduz desde o reconhecimento do agente patogênico até a resistência à doença. A genética é também o componente central na melhoria do germplasma através de cruzamento. Através da análise molecular e fenotípica dos cruzamentos genéticos, os loci que controlam as características de interesse podem ser mapeados e acompanhados nas gerações subsequentes. O conhecimento dos genes que são a base da variação fenotípica entre os números de acesso das plantas de cultivo pode possibilitar o desenvolvimento de marcadores que aumentam enormemente a eficiência do processo de melhoria do germplasma, assim como abre passagens para a descoberta de alelos superiores adicionais.

A genômica é o estudo no nível do sistema do genoma de um organismo, que inclui os genes e os produtos gênicos – RNA e proteínas. Em um primeiro nível, as abordagens genômicas forneceram grandes conjuntos de dados de informação de sequências provenientes de espécies vegetais distintas, incluindo sequências de cDNA de comprimento completo e parciais e a sequência genômica completa de uma espécie de planta modelo, *Arabidopsis thaliana*. Recentemente, o primeiro esboço da sequência ("draft sequence") do genoma de uma planta de cultivo, a do arroz (*Oryza sativa*), também se tornou disponível. A disponibilidade de uma sequência genômica inteira tornou possível o desenvolvimento de ferramentas para o

estudo no nível do sistema de outros complementos moleculares, tais como arranjos e chips para uso na determinação do complemento de genes expressos em um organismo sob condições específicas. Tais dados podem ser utilizados como uma primeira indicação do potencial para certos genes desempenhar funções chaves na expressão de fenótipos de plantas diferentes.

As abordagens da bioinformática se conectam por meio de interface diretamente com conjuntos de dados genômicos de primeiro nível permitindo o processamento para descobrir sequências de interesse através de interpretação ou outros meios. Utilizando, por exemplo, buscas de similaridade, alinhamentos e análises filogenéticas, a bioinformática pode frequentemente identificar homólogos de um produto gênico de interesse. Homólogos muito similares (por exemplo, > ~90% de identidade de aminoácidos em relação ao comprimento total da proteína) são muito provavelmente ortólogos, isto é, compartilham a mesma função em organismos diferentes.

A genômica funcional pode ser definida como a atribuição de função aos genes e seus produtos. Os esboços da genômica funcional provenientes da genética, da genômica e da bioinformática produzem uma via em direção à identificação de genes importantes em uma via ou resposta particular de interesse. A análise da expressão, por exemplo, utiliza microarranjos de DNA de alta densidade (frequentemente derivados do sequenciamento genômico em escala de organismos) para monitorar a expressão do mRNA de milhares de genes em um único experimento. Os tratamentos experimentais podem incluir aqueles que produzem uma resposta de interesse, tal como a resposta de resistência a doenças em plantas infectadas com um agente patogênico. Para fornecer exemplos adicionais do uso de microarranjos, os níveis de expressão de mRNA podem ser monitorados em tecidos diferentes ao longo de um curso de tempo do desenvolvimento ou em mutantes afetados em uma resposta de interesse. A proteômica também pode ajudar a atribuir uma função, através da análise da expressão e das modificações pós-tradução de centenas de proteínas em um único experimento.

As abordagens de proteômica são, em muitos casos, análogas às abordagens feitas para monitorar a expressão do mRNA em experimen-

tos em microarranjos. As interações proteína-proteína também podem ajudar a atribuir proteínas a uma certa via ou resposta, através da identificação de proteínas que interagem com componentes conhecidos da via ou da resposta. Para a genômica funcional, as interações proteína-proteína são frequentemente estudadas utilizando ensaios de duplo híbrido de levedura em grande escala. Uma outra abordagem para atribuir função gênica é expressar a proteína correspondente em um hospedeiro heterólogo, por exemplo, a bactéria *Escherichia coli*, seguida pela purificação e por ensaios enzimáticos.

A demonstração da capacidade de um gene de interesse de controlar uma certa característica pode ser derivada, por exemplo, do teste experimental em espécies vegetais de interesse. A produção e a análise de plantas transgênicas em relação a um gene de interesse podem ser utilizadas para a genômica funcional de plantas, com várias vantagens. O gene pode frequentemente ser tanto superexpresso quanto subexpresso ("nocauteado"), aumentando assim as chances de se observar um fenótipo que liga o gene a uma via ou uma resposta de interesse. Dois aspectos da genômica funcional transgênica ajudam a conceder um alto nível de confiança à atribuição funcional através dessa abordagem. Em primeiro lugar, as observações fenotípicas são realizadas no contexto da planta viva. Em segundo lugar, a faixa de fenótipos observados pode ser verificada e correlacionada com os níveis de expressão observados do transgene introduzido. A genômica funcional transgênica é especialmente valiosa no desenvolvimento de cultivares melhorados. Apenas os genes que funcionam em uma via ou uma resposta de interesse e que, em adição, são capazes de conferir um fenótipo baseado na característica desejada, são promovidos como genes candidatos para os esforços de melhoria da planta de cultivo. Em alguns casos, as *linhagens* transgênicas desenvolvidas para os estudos de genômica funcional podem ser diretamente utilizadas em estágios iniciais de desenvolvimento do produto.

Uma outra abordagem em direção à genômica funcional de plantas envolve uma primeira identificação de *linhagens* de plantas com mutações em genes específicos de interesse, seguida pela avaliação fenotípica

das consequências de tais nocautes do gene sobre a característica em estudo. Tal abordagem revela os genes essenciais para a expressão de características específicas.

Os genes identificados através da genômica funcional podem ser empregados diretamente em esforços para a melhoria de germoplasma através de meios transgênicos, como descrito anteriormente ou utilizados para desenvolver marcadores para a identificação do rastreamento de alelos de interesse no mapeamento e nas populações de cruzamento. O conhecimento de tais genes também pode possibilitar o constructo de alelos superiores que não existem na natureza, através de qualquer um de um número de métodos moleculares.

Os aumentos rápidos no rendimento ao longo dos últimos 80 anos nas plantas de cultivo em fileiras foram causados em uma medida aproximadamente equivalente à genética melhorada e práticas agronômicas melhoradas. Em particular, em uma planta de cultivo como o milho, a combinação de híbridos de alto rendimento e o uso de grandes quantidades de fertilizante de nitrogênio permitiu sob condições ideais rendimentos maiores que 3,83 L/m^2 (440bu/acre). Entretanto, o uso de grandes quantidades de fertilizante de nitrogênio possui efeitos colaterais negativos primariamente em torno do aumento dos custos deste insumo para o cultivador e dos custos para o ambiente uma vez que a poluição pelo nitrato é um problema principal em muitas áreas agrícolas contribuindo significativamente para a degradação tanto de ambientes de água doce quanto marinhos. O desenvolvimento da genética de plantas de cultivo que utilizam nitrogênio mais eficientemente através de um entendimento da função do genótipo do uso do nitrogênio seria altamente vantajoso na redução dos custos dos insumos para o cultivador assim como da carga ambiental. Isto é particularmente importante para uma planta de cultivo como o milho que é cultivado utilizando um alto nível de fertilizante de nitrogênio.

A eficiência do uso de nitrogênio pode ser definida de várias maneiras, embora a mais simples seja rendimento/N fornecido. Há dois estágios neste processo: primeiro, a quantidade de nitrogênio disponível que é

captada, armazenada e assimilada nos aminoácidos e outros compostos de nitrogênio importantes; segundo, a proporção de nitrogênio que é dividida para a semente, resultando no rendimento final. Uma variedade de estudos de campo foi realizada em várias plantas de cultivo importantes na agricultura para estudar este problema (Lawlor DW e outros 2001 em Lea PJ, Morot-Gaudry JF, eds. Plant Nitrogen. Berlin: Springer-Verlag 343-367; Lafitte HR e Edmeades GO 1994 Field Crops Res 39, 15-25; Lawlor DW 2002 J Exp Bot. 53, 773-87; Moll RH e outros 1982 Agron J 74, 562-564). Estes experimentos demonstraram que há um componente genético para a eficiência do uso de nitrogênio, mas não provaram ser satisfatórios na determinação de quais genes são importantes para este processo. Em adição, os cultivadores de milho de forma geral não direcionaram a manutenção do rendimento sob a limitação do fertilizante de nitrogênio. Estes tipos de experimentos no campo em relação ao uso de nitrogênio são difíceis por uma variedade de razões incluindo uma falta de uniformindade de nitrogênio acessível em um campo de teste ou entre sítios no campo sob qualquer regime de tratamento e o efeito recíproco de outros fatores ambientais que levam à dificuldade de interpretação dos experimentos.

Nas plantas, o nitrogênio está envolvido em duas funções. Na primeira, o nitrogênio afeta a biomassa da planta e o rendimento da planta de cultivo de forma notável como um macronutriente essencial (Lam HM e outros (1996) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47, 569-593). Na segunda, como um sinal importante, o nitrogênio regula a expressão de muitos genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio e do carbono (Crawford NM (1995) Plant Cell 7, 859-868; Stitt M (1999) Curr. Opin. Plant Biol. 2, 178-186) e modula o desenvolvimento da planta, tal como a ramificação e o desenvolvimento das raízes, o crescimento das folhas, a ramificação dos galhos e o tempo de florescência (Crawford NM & Forde BG (2002)). Para atingir o crescimento e o desenvolvimento ótimos, as plantas têm que adquirir nutriente de nitrogênio suficiente do solo, com a quantidade suficiente de nitrogênio variando entre dois e cinco por cento do peso seco da planta dependendo da espécie vegetal e do estágio do desenvolvimento (Marschner,

1995). Entretanto, devido ao fato de que o teor de nitrogênio no solo é frequentemente reduzido por muitos fatores abióticos e bióticos tais como a erosão do solo, a lixívia pela água da chuva e o consumo por microorganismos (Good e outros, 2004), as plantas são frequentemente submetidas a uma condição de crescimento com limitação de nitrogênio. Portanto, a capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio é uma estratégia de sobrevivência importante para que as plantas terminem de forma bem-sucedida seus ciclos de vida para a produção de prole, ao invés de morrerem precocemente e ficarem improdutivas quando a disponibilidade de nitrogênio for limitada. Nas plantas de cultivo, foi observado que esta capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio está positivamente relacionada aos seus rendimentos. Tollenaar e Wu (1999) relataram que o aumento da tolerância dos cultivares de milho à limitação de nitrogênio contribuía significativamente com a melhoria genética dos rendimentos do milho ao longo das últimas várias décadas. Muitos estudos demonstraram que híbridos de milho recém-liberados poderiam crescer mais vigorosamente e produziam maiores rendimentos que os mais antigos quando cultivados sob condições de crescimento com limitação de nitrogênio, indicando que os híbridos de milho mais novos possuem a capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio mais forte que a dos mais antigos (Castleberry e outros, 1984; Duvick, 1984, 1997; McCullough e outros, 1994; Ding e outros, 2005). Isto sugere que o aumento da capacidade de adaptação de cultivares de milho à limitação de nitrogênio poderia aumentar o rendimento das plantas de cultivo e possivelmente permitir uma redução na quantidade de fertilizante de nitrogênio necessária.

O reforço da capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio dos cultivares de plantas de cultivo é importante para a prática agrícola atual, em que grandes quantidades de fertilizante de nitrogênio são aplicadas nas plantas de cultivo para aumentar seu rendimento (Frink e outros, 1999) e em que mais de 50% dos nutrientes de nitrogênio aplicados são perdidos do sistema planta de cultivo-solo (Peoples e outros, 1995). Assim, o uso de grandes quantidades de fertilizantes de nitrogênio aumenta inevitavelmente

o custo da produção de plantas de cultivo e também leva a um nível significativo de poluição de nitrogênio (Good e outros, 2004). O desenvolvimento de cultivares com uma maior capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio poderia tornar possível reduzir isto enquanto mantém o redimento das plantas de cultivo e diminui o área afetada ambiental da agricultura de produção (Ding e outros, 2005).

O mecanismo molecular através do qual as plantas se adaptam à condição de crescimento com limitação de nitrogênio não foi descrito e os fatores fisiológicos e bioquímicos especificamente envolvidos na adaptação das plantas à limitação de nitrogênio ainda não foram estudados sistematicamente. Entretanto, um número de estudos em relação ao efeito do estresse de nitrogênio sobre o crescimento e o desenvolvimento das plantas foi realizado e partindo destes, podem ser deduzidas algumas das respostas adaptativas de limitação de nitrogênio das plantas. Estas incluem a redução do crescimento e da fotossíntese, a remobilização de nitrogênio de órgãos maduros velhos para os em crescimento ativo e um acúmulo de antocianina abundante (Khamis e outros, 1990; Geiger e outros, 1999; Ding e outros, 2005; Mei e Thimann, 1984; Ono e outros, 1996; Bongue-Bartelsman e Phillops, 1995; Chalker-Scott, 1999; Diaz e outros, 2006). Em adição, as descobertas a seguir sugerem que as plantas estão equipadas com mecanismos moleculares que controlam sua capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio. Em *Arabidopsis*, o produto da transcrição de *NRT2.1*, um transportador de nitrato de alta afinidade, aumentou significativamente pela limitação de nitrato (Filleur e outros, 2001). Todd e outros (2004) observaram que a expressão de um gene similar a MYB *AtNsr1* era notavelmente e especificamente regulado para mais em virtude da deficiência de nitrogênio. Recentemente, Diaz e outros (2006) relataram que as plantas de *Arabidopsis* em crescimento sob condições de baixa concentração de nitrogênio resultaram na quebra de clorofila nas folhas das rosetas velhas e no acúmulo de antocianina na roseta toda. Quinze loci de características quantitativas (QTLs) foram identificados no controle destas respostas de crescimento causadas pela limitação de nitrogênio (Diaz e outros, 2006). Entretanto, nenhum mu-

tante defeituoso no desenvolvimento das repostas adaptativas para a limitação de nitrogênio foi observado. Consequentemente, nada é conhecido ainda em relação ao mecanismo molecular que controla este fenômeno.

As antocianinas são uma variedade de fenilpropanóides, uma classe de compostos orgânicos derivados de plantas que são biossintetizados partindo do aminoácido fenilalanina. Os fenilpropanóides possuem uma ampla variedade de funções, incluindo defesa contra herbívoros, ataque microbiano ou outras fontes de danos; como componentes estruturais das paredes ceulares (isto é, lignina); como proteção da luz ultravioleta; como pigmentos (por exemplo, antocianinas); e como moléculas de sinalização. A biossíntese da antocianina começa com a condensação de p-coumaroil-CoA e malonil-CoA pela enzima chalcona sintase (CHS) para produzir o intermediário chalcona. P-coumaroil-CoA representa um ponto de ramificação importante no metabolismo de fenilproanóide uma vez que este é um intermediário na produção tanto de antocianinas quanto de lignina. O uso de p-coumaroil-CoA pela CHS controla a biossíntese do fenilpropanóide em direção aos flavanóides e às antocianinas, enquanto que o uso de p-coumaroil-CoA por várias outras enzimas leva à biossíntese de lignina. As antocianinas geralmente não estão presentes na folha até a quebra da clorofila, durante cujo período de tempo a planta começa a sintetizar a antocianina, presumidamente para a fotoproteção durante o deslocamento do nitrogênio.

É sabido que a ubiquitinação das proteínas desempenha funções centrais na regulação de vários processos celulares em eucariotos. Em primeiro lugar, as vias de ubiquitinação das proteínas se direcionam para vários substratos tais como fatores de transcrição nucleares, proteínas citoplasmáticas anormais e proteínas reguladoras de vida curta para a degradação pelo proteassoma 26S (Glickman e Ciechanover, 2002). Em segundo lugar, a modificação das proteínas com ubiquitina também regula a localização, a atividade, os parceiros de interação e as funções das proteínas de uma maneira independente de proteassomas (Schnell e Hicke, 2003; Sun e Chen, 2004).

As ubiquitina E3 ligases do tipo RING são responsáveis pelo

direcionamento de proteínas com substratos específicos para ubiquitinação. O domínio RING é um dedo de Zn do tipo C3HC4 que liga dois átomos de zinco e pode estar envolvido na mediação de interações proteína-proteína. Em *Arabidopsis*, a caracterização funcional de algumas proteínas que contêm RING tais como COP1 e SINATA5 sugere que a função biológica do domínio RING é participar na degradação de proteínas dependente de ubiquitina (Moon e outros, 2004) e assim desempenha uma função central e essencial na regulação celular eucariótica (Glickman e Ciechanover, 2002). Stone e outros (2005) relataram que o genoma de *Arabidopsis* codifica 469 supostas proteínas contendo RING, que podem ser agrupadas em oito tipos (Stone e outros, 2005). No entanto, não é claro se todos os genes do tipo dedo RING são E3 ubiquitina ligases (Moon e outros, 2005).

Em plantas, a função *in vivo* das ubiquitina ligases do tipo RING permanece muito pouco definida, com o genoma de *Arabidopsis* codificando 469 proteínas do domínio RING previsto (Stone e outros 2005).

Sumário da Invenção

Em uma tentativa de determinar os mecanismos moleculares que controlam a capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio em plantas, os presentes inventores isolaram e caracterizaram um mutante de *Arabidopsis*, chamado *"lines"* (*low inorganic nitrogen-induced early senescence – senescência precoce induzida por baixo teor de nitrogênio inorgânico*), que perdeu sua capacidade de se adaptar à limitação de nitrogênio. Quando supridas com nutrição de nitrogênio inorgânico insuficiente (nitrato ou amônio), as plantas mutantes "*lines*" falham em desenvolver as respostas adaptativas essenciais à limitação de nitrogênio e consequentemente sofrem senescência muito mais cedo e mais rapidamente que as plantas do tipo selvagem. Este fenótipo de senescência precoce induzido pelo baixo teor de nitrogênio poderia ser recuperado através do fornecimento às plantas *lines* de uma dosagem alta de fertilizante de nitrogênio. Uma análise fisiológica, bioquímica e molecular detalhada demonstrou que quando as plantas *lines* mutantes eram supridas com nutriente nitrogênio limitado (3 mM de nitrato), ocorriam efeitos no desenvolvimento de um conjunto inteiro de respostas adaptativas

essenciais à limitação de nitrogênio e assim havia uma falha em se aclimatarem com a condição de crescimento com limitação de nitrogênio.

O gene *LINES* do tipo selvagem (At1g02860) foi adicionalmente identificado através de uma abordagem de clonagem baseada no mapa e é previsto que codifique uma ubiquitina ligase do tipo RING. Isto sugere que a proteína *LINES* funcional participa na degradação ou na modificação de proteínas mediada pela ubiquitinação de regulador(es) negativo(s) chave(s) na via de sinalização de limitação de nitrogênio de *Arabidopsis*. A proteína truncada codificada pelos mutantes *lines* não possui o domínio RING em tem a capacidade de se adaptar à limitação de nitrogênio defeituosa. Assim, os inventores forneceram a primeira visão do mecanismo molecular que controla a capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio de uma planta.

A capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio é uma característica essencial para as plantas e é positivamente correlacionada com o rendimento da planta de cultivo. Vários fatores bióticos e abióticos que consomem nitrogênio no solo criam frequentemente uma condição de crescimento com limitação de nitrogênio. Para lidar com isso, as plantas desenvolveram um grupo de respostas adaptativas para a limitação de nitrogênio. Entretanto, o conhecimento é limitado às alterações fisiológicas e bioquímicas envolvidas nestas respostas adaptativas e nada era sabido anteriormente em relação ao mecanismo molecular que controla a capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio das plantas. A proteína do domínio RING descrita aqui está envolvida na mediação da resposta adaptativa de plantas à limitação de nitrogênio.

Consequentemente, a presente invenção refere-se a um método de modulação de uma característica em uma planta ou uma célula vegetal que compreende a modulação da expressão de uma ubiquitina E3 ligase do tipo RING na planta ou na célula vegetal. Em uma modalidade da invenção, a expressão da ubiquitina E3 ligase do tipo RING é modulada através da administração, à célula, de uma quantidade eficiente de um agente que pode modular os níveis de expressão de um gene da ubiquitina E3 ligase do tipo RING na célula vegetal. Em uma modalidade adicional da invenção, o agen-

te aumenta os níveis de expressão de uma ubiquitina E3 ligase do tipo RING na célula vegetal.

A característica que será modulada na planta pode ser qualquer característica agronômica de interesse. Em uma modalidade da invenção, a característica é qualquer uma que é afetada pelo metabolismo de nitrogênio, carbono e/ou enxofre, pela biossíntese de lipídeos, pela percepção de nutrientes, pela adaptação nutricional, pelo transporte de elétrons e/ou pela conservação de energia associada à membrana. Em uma modalidade adicional da invenção, a característica é selecionada de um ou mais de utilização de nitrogênio, rendimento, crescimento celular, reprodução, fotossíntese, assimilação de nitrogênio, resistência a doenças, diferenciação, transdução de sinal, regulação gênica, tolerância a estresse abiótico e composição nutricional. Ainda em uma modalidade adicional da invenção a característica modulada é um aumento ou uma melhoria em um ou mais de utilização de nitrogênio, rendimento, crescimento celular, reprodução, fotossíntese, assimilação de nitrogênio, biossíntese de lignina, biossíntese de antocianina, resistência a doenças, diferenciação, transdução de sinal, regulação gênica, tolerância a estresse abiótico e composição nutricional.

A planta ou a célula vegetal pode ser proveniente de qualquer planta em que se deseja modular uma característica. Em uma modalidade da invenção, a célula vegetal é uma dicotiledônea, uma gimnosperma ou uma monocotiledônea. Em uma modalidade, a dicotiledônea é selecionada do grupo que consiste em soja, tabaco ou algodão. Em uma modalidade adicional da invenção, a monocotiledônea é selecionada de milho, trigo, cevada, aveia, centeio, painço, sorgo, triticale, secale, *Trigo einkorn*, espelta, *Trigo emmer*, teff, sorgo, linho, grama, *Tripsacum sp.* e teosinte.

Em uma modalidade da invenção, o agente que pode modular os níveis de expressão de um gene da ubiquitina E3 ligase do tipo RING gene em uma célula vegetal compreende:

(a) uma sequência de nucleotídeos das SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 ou um fragmento ou um domínio da mesma;

(b) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo de

qualquer uma das SEQ ID Nºs: 2, 4, 6, 8, 10, um fragmento ou um domínio da mesma;

(c) uma sequência de nucleotídeos que possui similaridade substancial a (a) ou (b);

(d) uma sequência de nucleotídeos capaz de se hibridizar com (a), (b) ou (c);

(e) uma sequência de nucleotídeos complementar a (a), (b), (c) ou (d); ou

(f) uma sequência de nucleotídeos que é o complemento inverso de (a), (b), (c) ou (d).

Em uma modalidade preferida da invenção a característica modulada é um aumento ou aperfeiçoamento em um ou mais de utilização de nitrogênio, rendimento, crescimento celular, reprodução, fotossíntese, assimilação de nitrogênio, biossíntese de lignina, biossíntese de antocianina, resistência a doenças, diferenciação, transdução de sinal, regulação gênica tolerância a estresse abiótico e composição nutricional.

Em uma modalidade particular, a presente invenção refere-se a um método de melhoria da utilização de nitrogênio em uma planta ou em uma célula vegetal que compreende o aumento da expressão de um gene da ubiquitina E3 ligase do tipo RING na planta ou na célula vegetal. A melhoria da utilização de nitrogênio em uma planta permitirá que quantidades reduzidas de fertilizante de nitrogênio sejam aplicadas na planta com uma redução concomitante nos custos para o agricultor e nos custos para o ambiente uma vez que a poluição de nitrato é um problema principal em muitas áreas agrícolas contribuindo para a degradação tanto de ambientes de água doce quanto marinhos. Além disso, a melhoria da utilização de nitrogênio pode permitir o cultivo de novas variedades e espécies em ambientes que são de outra maneira inadequados para o cultivo das ditas novas variedades e espécies.

Em uma modalidade da invenção, o agente que aumentam os níveis de expressão de um gene da ubiquitina E3 ligase do tipo RING na célula vegetal compreende uma molécula de ácido nucléico que codifica

uma ubiquitina E3 ligase do tipo RING.

Em uma modalidade da invenção, o agente que aumenta os níveis de expressão de um gene da ubiquitina E3 ligase do tipo RING em uma célula vegetal compreende:

(a) uma sequência de nucleotídeos das SEQ ID Nºs: 1, 5, 7, 9 ou um fragmento ou um domínio da mesma;

(b) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo de qualquer uma das SEQ ID Nºs: 2, 6, 8, 10, um fragmento ou um domínio da mesma;

(c) uma sequência de nucleotídeos que possui similaridade substancial a (a) ou (b);

(d) uma sequência de nucleotídeos capaz de se hibridizar com (a), (b) ou (c);

(e) uma sequência de nucleotídeos complementar a (a), (b), (c) ou (d); ou

(f) uma sequência de nucleotídeos que é o complemento inverso de (a), (b), (c) ou (d).

Em uma modalidade específica, a similaridade substancial é pelo menos aproximadamente 65% de identidade, especificamente aproximadamente 80% de identidade, especificamente 90% e mais especificamente pelo menos aproximadamente 95% de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeos listada como a SEQ ID Nº: 1 ou um fragmento ou um domínio da mesma.

Em uma modalidade, a sequência que possui similaridade substancial à sequência de nucleotídeos da SEQ ID Nº: 1, um fragmento ou um domínio da mesma, é proveniente de uma planta. Em uma modalidade específica, a planta é uma dicotiledônea. Em uma modalidade mais específica, a dicotiledônea é selecionada do grupo que consiste em soja, tabaco, álamo ou algodão. Em uma outra modalidade específica, a planta é uma gimnosperma. Em uma outra modalidade específica, a planta é uma monocotiledônea. Em uma modalidade mais específica, a monocotiledônea é um cereal. Em uma modalidade mais específica, o cereal pode ser, por exemplo, milho,

trigo, cevada, aveia, centeio, painço, sorgo, triticale, secale, *Trigo einkorn*, espelta, *Trigo emmer*, teff, sorgo, linho, grama, Tripsacum sp. ou teosinte.

Em uma modalidade específica, o ácido nucléico isolado compreende ou consiste em uma sequência de nucleotídeos capaz de se hibridizar com uma sequência de nucleotídeos listada na SEQ ID Nº: 1 ou um fragmento ou um domínio da mesma. Em uma modalidade específica, a hibridização permite que a sequência forme um dúpléx em estringência média ou alta. As modalidades da presente invenção abrangem ainda uma sequência de nucleotídeos complementar a uma sequência de nucleotídeos da SEQ ID Nº: 1 ou um fragmento ou um domínio da mesma. As modalidades da presente invenção abrangem ainda uma sequência de nucleotídeos complementar a uma sequência de nucleotídeos que possui similaridade substancial ou é capaz de se hibridizar com uma sequência de nucleotídeos da SEQ ID Nº: 1 ou um fragmento ou um domínio da mesma.

Em uma modalidade específica, a sequência de nucleotídeos que possui similaridade substancial é uma variação alélica da sequência de nucleotídeos da SEQ ID Nº: 1, um fragmento ou um domínio da mesma. Em uma modalidade alternativa, a sequência que possui similaridade substancial é uma variação que ocorre naturalmente. Em uma outra modalidade alternativa, a sequência que possui similaridade substancial é uma variação polimórfica da sequência de nucleotídeos da SEQ ID Nº: 1 ou um fragmento ou um domínio da mesma.

Em uma modalidade específica, o ácido nucléico isolado contém um grande número de regiões que possuem a sequência de nucleotídeos da SEQ ID Nº: 1 ou um éxon ou um domínio da mesma.

Em uma modalidade específica, a sequência que possui similaridade substancial contém uma deleção ou uma inserção de pelo menos um nucleotídeo. Em uma modalidade mais específica, a deleção ou a inserção é menor que aproximadamente trinta nucleotídeos. Em uma modalidade mais específica, a deleção ou a inserção é menor que aproximadamente cinco nucleotídeos.

Em uma modalidade específica, a sequência do ácido nucléico

isolado que possui similaridade substancial compreende ou consiste em uma substituição em pelo menos um códon. Em uma modalidade específica, a substituição é conservativa.

Em uma modalidade adicional da invenção, a molécula de ácido nucléico compreende a sequência do gene AT1g02860 da SEQ ID Nº: 1 ou um fragmento funcional da mesma. Ainda em uma modalidade adicional da invenção, a molécula de ácido nucléico compreende uma sequência que se hibridiza sob condições de estringência média com o gene AT1g02860 da SEQ ID Nº: 1 ou um fragmento funcional da mesma. Em uma outra modalidade da presente invenção, a molécula de ácido nucléico é derivada da sequência de nucleotídeos do gene AT1g02860 da SEQ ID Nº: 1 e possui uma sequência de nucleotídeos que compreende códons específicos para expressão em plantas. Ainda em uma outra modalidade da invenção, o ácido nucléico é a *mutação lines* do gene AT1g02860 que compreende a sequência da SEQ ID Nº: 3 ou um fragmento funcional da mesma, que codifica o polipeptídeo da SEQ ID Nº: 4. Ainda em uma outra modalidade da invenção, a molécula de ácido nucléico é o homóloto de *Arabidopsis* do gene AT1g02860 que compreende a sequência do gene AT2g38920 da SEQ ID Nº: 5 ou um fragmento funcional da mesma, que codifica o polipeptídeo da SEQ ID Nº: 6. Ainda em uma outra modalidade da invenção, a molécula de ácido nucléico é o homólogo do arroz do gene AT1g02860 que compreende a sequência de nucleotídeos da SEQ ID Nº: 7 ou um fragmento funcional da mesma, que codifica o polipeptídeo da SEQ ID Nº: 8. Ainda em uma outra modalidade da invenção, a molécula de ácido nucléico é um homólogo do arroz do gene AT1g02860 que compreende a sequência de nucleotídeos da SEQ ID Nº: 9 ou um fragmento funcional da mesma, que codifica o polipeptídeo da SEQ ID Nº: 10.

Em uma outra modalidade, a característica modulada é um decréscimo ou uma redução e um ou mais de utilização de nitrogênio, rendimento, crescimento celular, reprodução, fotossíntese, assimilação de nitrogênio, biossíntese de lignina, biossíntese de antocianina, resistência a doenças, diferenciação, transdução de sinal, regulação gênica, tolerância a es-

tresse abiótico e composição nutricional. Em tal modalidade, o agente inibirá a expressão de uma ubiquitina E3 ligase similar a RING. Tais agentes são descritos na Seção VI e podem ser selecionados de oligonucleotídeos antissenso, aptâmeros e moléculas de RNA de filamento duplo ou complexos de silenciamento induzidos por RNA. Tais agentes podem interferir na expressão das ubiquitina ligases similares a RING das SEQ ID Nºs: 1, 5, 7 ou 9.

Em uma modalidade da presente invenção, quando o agente é uma sequência de ácido nucléico, a sequência de ácido nucléico é expressa em uma localização ou em um tecido específico da planta. A localização ou o tecido é, por exemplo, mas não limitado a epiderme, raiz, tecido vascular, meristema, câmbio, córtex, seiva, folha e/ou flor. Em uma modalidade alternativa, a localização ou o tecido é uma semente.

As modalidades da presente invenção se referem ainda ao uso de uma molécula de ácido nucléico embaralhada para a modulação de uma característica em uma célula vegetal, a dita molécula de ácido nucléico embaralhada contendo um grande número de fragmentos de sequências de nucleotídeos, em que pelo menos um dos fragmentos codifica uma ubiquitina E3 ligase similar a RING e em que pelo menos dois do grande número de fragmentos de sequências estão em ordem, de 5' para 3' que não é uma ordem em que o grande número de fragmentos ocorre naturalmente em um ácido nucléico. Em uma modalidade específica, todos os fragmentos em uma molécula de ácido nucléico embaralhada contendo um grande número de fragmentos de sequências de nucleotídeos são provenientes de um único gene. Em uma modalidade mais específica, o grande número de fragmentos são originados de pelo menos dois genes diferentes. Em uma modalidade mais específica, o ácido nucléico embaralhado está ligado de forma operacional com uma sequência promotora. Uma outra modalidade mais específica é um uso de um polinucleotídeo quimérico para a modulação de uma característica em uma célula vegetal, o dito polinucleotídeo quimérico incluindo uma sequência promotora ligada de forma operacional com o ácido nucléico embaralhado. Em uma modalidade mais específica, o ácido nucléico embaralhado está contido dentro de uma célula hospedeira.

Em uma modalidade adicional da invenção, o agente que pode modular os níveis de expressão de um gene da ubiquitina E3 ligase similar a RING em uma célula vegetal compreende:

(a) uma sequência de polipeptídeo que é mostrada em qualquer uma das SEQ ID Nºs: 2, 4, 6, 8, 10 ou um fragmento funcional, um domínio, uma repetição ou uma quimera da mesma;

(b) uma sequência de polipeptídeo que possui similaridade substancial a (a);

(c) uma sequência de polipeptídeo codificada por uma sequência de nucleotídeos idêntica a ou que possui similaridade substancial a uma sequência de nucleotídeos listada nas SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 ou um fragmento ou um domínio funcional da mesma ou uma sequência complementar à mesma; ou

(d) uma sequência de polipeptídeo codificada por uma sequência de nucleotídeos capaz de se hibridizar sob condições de estringência média com uma sequência de nucleotídeos listada nas SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 ou com uma sequência complementar à mesma.

Em uma modalidade mais específica, o polipeptídeo contém uma sequência de polipeptídeo de qualquer uma das SEQ ID Nºs: 2, 4, 6, 8, 10 ou um fragmento da mesma. Em uma modalidade mais específica, o polipeptídeo é um polipeptídeo de planta. Em uma modalidade mais específica, a planta é uma dicotiledônea. Em uma modalidade mais específica, a planta é uma gimnosperma. Em uma modalidade mais específica, a planta é uma monocotiledônea. Em uma modalidade mais específica, a monocotiledônea é um cereal. Em uma modalidade mais específica, o cereal pode ser, por exemplo, milho, trigo, cevada, aveia, centeio, painço, sorgo, triticale, secale, *Trigo einkorn*, espelta, *Trigo emmer*, teff, sorgo, linho, grama, *Tripsacum* e teosinte.

Em uma modalidade, o polipeptídeo é expresso ao longo de toda a planta. Em uma modalidade mais específica, o polipeptídeo é expresso em uma localização ou em um tecido específico de uma planta. Em uma modalidade mais específica, a localização ou o tecido pode ser, por exem-

plo, epiderme, raiz, tecido vascular, meristema, câmbio, córtex, seiva, folha e flor. Em uma modalidade mais específica, a localização ou o tecido é uma semente.

Em uma modalidade específica, o polipeptídeo é útil para produzir um anticorpo que possui imunorreatividade contra um polipeptídeo codificado por uma sequência de nucleotídeos da SEQ ID Nº: 2 ou um fragmento ou um domínio da mesma.

Em uma modalidade específica, um polipeptídeo que possui similaridade substancial a uma sequência de polipeptídeo listada na SEQ ID Nº: 2 ou um éxon ou um domínio da mesma, é uma variação alélica da sequência de polipeptídeo listada na SEQ ID Nº: 2. Em uma outra modalidade específica, um polipeptídeo que possui similaridade substancial a uma sequência de polipeptídeo listada na SEQ ID Nº: 2 ou um éxon ou um domínio da mesma, é uma variação que ocorre naturalmente da sequência de polipeptídeo listada na SEQ ID Nº: 2. Em uma outra modalidade específica, um polipeptídeo que possui similaridade substancial a uma sequência de polipeptídeo listada na SEQ ID Nº: 2 ou um éxon ou um domínio da mesma, é uma variação polimórfica da sequência de polipeptídeo listada na SEQ ID Nº: 2.

Em uma outra modalidade específica, o polipeptídeo é uma sequência de polipeptídeo da SEQ ID Nº: 2. Em uma outra modalidade específica, o polipeptídeo é um fragmento ou um domínio funcional. Ainda em uma outra modalidade específica, o polipeptídeo é uma quimera, em que a quimera pode incluir domínios de proteína funcionais, incluindo domínios, repetições, sítios de modificação pós-tradução ou outras características. Em uma modalidade mais específica, o polipeptídeo é um polipeptídeo de planta. Em uma modalidade mais específica, a planta é uma dicotiledônea. Em uma modalidade mais específica, a planta é uma gimnosperma. Em uma modalidade mais específica, a planta é uma monocotiledônea. Em uma modalidade mais específica, a monocotiledônea é um cereal. Em uma modalidade mais específica, o cereal pode ser, por exemplo, milho, trigo, cevada, aveia, centeio, painço, sorgo, triticale, secale, *Trigo einkorn*, espelta, *Trigo emmer*, teff,

sorgo, linho, grama, *Tripsacum* e teosinte.

Em uma modalidade específica, o polipeptídeo é expresso em uma localização ou em um tecido específico de uma planta. Em uma modalidade mais específica, a localização ou o tecido pode ser, por exemplo, epiderme, raiz, tecido vascular, meristema, câmbio, córtex, seiva, folha e flor. Em uma outra modalidade específica, a localização ou o tecido é uma semente.

Em uma modalidade específica, a sequência de polipeptídeo codificada por uma sequência de nucleotídeos que possui similaridade substancial a uma sequência de nucleotídeos da SEQ ID Nº: 1 ou um fragmento ou um domínio da mesma ou uma sequência complementar à mesma, inclui uma deleção ou uma inserção de pelo menos um nucleotídeo. Em uma modalidade mais específica, a deleção ou a inserção é menor que aproximadamente trinta nucleotídeos. Em uma modalidade mais específica, a deleção ou a inserção é menor que aproximadamente cinco nucleotídeos.

Em uma modalidade específica, a sequência de polipeptídeo codificada por uma sequência de nucleotídeos que possui similaridade substancial a uma sequência de nucleotídeos da SEQ ID Nº: 1 ou um fragmento ou um domínio da mesma ou uma sequência complementar à mesma, inclui uma substituição de pelo menos um códon. Em uma modalidade mais específica, a substituição é conservativa.

Em uma modalidade específica, as sequências de polipeptídeos que possuem similaridade substancial à sequência de polipeptídeo da SEQ ID Nº: 2 ou um fragmento, um domínio, uma repetição ou quimeras da mesma incluem uma deleção ou uma inserção de pelo menos um aminoácido.

Em uma modalidade específica, as sequências de polipeptídeos que possuem similaridade substancial à sequência de polipeptídeo da SEQ ID Nº: 2 ou um fragmento, um domínio, uma repetição ou quimeras da mesma incluem uma substituição de pelo menos um aminoácido.

As modalidades da presente invenção consideram ainda um uso de um cassete de expressão para a modulação de uma característica em uma célula vegetal que inclui uma sequência promotora ligada de forma ope-

racional com um ácido nucléico isolado que codifica uma ubiquitina E3 ligase similar a RING. Nas modalidades da invenção, o ácido nucléico isolado que codifica uma ubiquitina E3 ligase similar a RING consiste em ou compreende:

(a) uma sequência de nucleotídeos das SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 ou um fragmento ou um domínio da mesma;

(b) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo de qualquer uma das SEQ ID Nºs: 2, 4, 6, 8, 10, um fragmento ou um domínio da mesma;

(c) uma sequência de nucleotídeos que possui similaridade substancial a (a) ou (b);

(d) uma sequência de nucleotídeos capaz de se hibridizar com (a), (b) ou (c);

(e) uma sequência de nucleotídeos complementar a (a), (b), (c) ou (d); ou

(f) uma sequência de nucleotídeos que é o complemento inverso de (a), (b), (c) ou (d).

É adicionalmente abrangido dentro da invenção o uso de um vetor recombinante para a modulação de uma característica em uma célula vegetal que compreende um cassete de expressão que inclui uma sequência promotora ligada de forma operacional com um ácido nucléico isolado que codifica uma ubiquitina E3 ligase similar a RING. Nas modalidades da invenção, o vetor recombinante compreende um ácido nucléico isolado que codifica uma ubiquitina E3 ligase similar a RING que consiste em ou compreende:

(a) uma sequência de nucleotídeos das SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 ou um fragmento ou um domínio da mesma;

(b) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo de qualquer uma das SEQ ID Nºs: 2, 4, 6, 8, 10, um fragmento ou um domínio da mesma;

(c) uma sequência de nucleotídeos que possui similaridade substancial a (a) ou (b);

(d) uma sequência de nucleotídeos capaz de se hibridizar com (a), (b) ou (c);

(e) uma sequência de nucleotídeos complementar a (a), (b), (c) ou (d); ou

(f) uma sequência de nucleotídeos que é o complemento inverso de (a), (b), (c) ou (d).

São também abrangidos os usos de células vegetais, que contêm cassetes de expressão, de acordo com a presente descrição e os usos de plantas, que contêm estas células vegetais.

São também abrangidas as células vegetais, que contêm cassetes de expressão, de acordo com a presente descrição e plantas, que contêm estas células vegetais. Em uma modalidade específica, a planta é uma dicotiledônea. Em uma modalidade mais específica, a dicotiledônea é selecionada do grupo que consiste em soja, tabaco, álamo ou algodão. Em uma outra modalidade específica, a planta é uma gimnosperma. Em uma outra modalidade específica, a planta é uma monocotiledônea. Em uma modalidade mais específica, a monocotiledônea é um cereal. Em uma modalidade mais específica, o cereal pode ser, por exemplo, milho, trigo, cevada, aveia, centeio, painço, sorgo, triticale, secale, *Trigo einkorn*, espelta, *Trigo emmer*, teff, sorgo, linho, grama, *Tripsacum* e teosinte.

Em uma modalidade, o cassete de expressão é expresso ao longo de toda a planta. Em uma outra modalidade, o cassete de expressão é expresso em uma localização ou em um tecido específico de uma planta. Em uma modalidade específica, a localização ou o tecido pode ser, por exemplo, epiderme, raiz, tecido vascular, meristema, câmbio, córtex, seiva, folha e flor. Em uma modalidade específica alternativa, a localização ou o tecido é uma semente.

As modalidades da presente invenção fornecem ainda o uso de semente e de produto isolado de plantas para a modulação de uma característica em uma célula vegetal, que contêm um cassete de expressão que inclui uma sequência promotora ligada de forma operacional com um ácido nucléico isolado que codifica um gene da ubiquitina E3 ligase similar a RING

de acordo com a presente invenção.

Em uma modalidade específica, o vetor de expressão inclui um ou mais elementos tais como, por exemplo, mas não limitados a uma sequência intensificadora do promotor, uma sequência marcadora para seleção, uma origem de replicação, uma sequência que codifica uma marcação de epítopo ou uma sequência que codifica uma marcação para purificação por afinidade. Em uma modalidade mais específica, a sequência intensificadora do promotor pode ser, por exemplo, o promotor 35S do CaMV, o promotor 19S do CaMV, o promotor PR-1a do tabaco, a ubiquitina e o promotor da faseolina. Em uma outra modalidade, o promotor pode ser operacional em plantas e mais especificamente, um promotor constitutivo ou que pode ser induzido. Em uma outra modalidade específica, a sequência marcadora para seleção codifica um gene de resistência a antibiótico. Em uma outra modalidade específica, a sequência de marcação de epítopo codifica V5, o peptídeo Phe-His-His-Thr-Thr, hemaglutinina ou glutationa-S-transferase. Em uma outra modalidade específica, a sequência de marcação para purificação por afinidade codifica uma sequência de poliaminoácido ou um polipeptídeo. Em uma modalidade mais específica, a sequência de poliaminoácido é polihistidina. Em uma modalidade mais específica, o polipeptídeo é o domínio de ligação com a quitina ou glutationa-S-transferase. Em uma modalidade mais específica, a sequência de marcação para purificação por afinidade compreende uma sequência que codifica inteína.

Em uma modalidade específica, o vetor de expressão é um vetor de expressão eucariótico ou um vetor de expressão procariótico. Em uma modalidade mais específica, o vetor de expressão eucariótico inclui um promotor específico ao tecido. Mais especificamente, o vetor de expressão é operacional em plantas.

As modalidades da presente invenção se referem ainda a uma planta modificada por um método que inclui a introdução em uma planta de um ácido nucléico em que o ácido nucléico pode ser expresso na planta em uma quantidade eficiente para realizar a modificação. A modificação pode ser um aumento ou um decréscimo em uma ou mais das características de

interesse. A modificação pode incluir superexpressão, subexpressão, modulação antissenso, supressão senso, expressão que pode ser induzida, repressão que pode ser induzida ou modulação que pode ser induzida de um gene. Em uma modalidade da invenção, a modificação envolvia um aumento ou uma melhoria na característica de interesse, por exemplo, utilização de nitrogênio ou rendimento.

Em uma modalidade, o cassete de expressão está envolvido em uma função tal como, por exemplo, mas não limitada a metabolismo de carbono, nitrogênio e/ou enxofre, utilização de nitrogênio, assimilação de nitrogênio, fotossíntese, biossíntese de lignina, biossíntese de antocianina, transdução de sinal, crescimento celular, reprodução, resistência a doenças, tolerância a estresse abiótico, composição nutricional, regulação gênica e/ou diferenciação. Em uma modalidade mais específica, o cassete de expressão está envolvido em uma função tal como utilização de nitrogênio, tolerância a estresse abiótico, maior rendimento, resistência a doenças e/ou composição nutricional.

Em uma modalidade, a planta contém uma modificação em um fenótipo ou uma característica que pode ser medida da planta, a modificação podendo ser atribuída à expressão de pelo menos um gene contido no cassete de expressão. Em uma modalidade específica, a modificação pode ser, por exemplo, metabolismo de carbono, nitrogênio e/ou enxofre, utilização de nitrogênio, assimilação de nitrogênio, fotossíntese, biossíntese de lignina, biossíntese de antocianina, transdução de sinal, crescimento celular, reprodução, resistência a doenças, tolerância a estresse abiótico, composição nutricional, regulação gênica e/ou diferenciação.

As modalidades da presente invenção fornecem ainda semente e produtos isolados de plantas que contêm um cassete de expressão que inclui uma sequência promotora ligada de forma operacional com um ácido nucléico isolado contendo uma sequência de nucleotídeos incluindo:

(a) uma sequência de nucleotídeos das SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 ou um fragmento ou um domínio da mesma;

(b) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo

de qualquer uma das SEQ ID Nºs: 2, 4, 6, 8, 10, um fragmento ou um domínio da mesma;

(c) uma sequência de nucleotídeos que possui similaridade substancial a (a) ou (b);

(d) uma sequência de nucleotídeos capaz de se hibridizar com (a), (b) ou (c);

(e) uma sequência de nucleotídeos complementar a (a), (b), (c) ou (d); ou

(f) uma sequência de nucleotídeos que é o complemento inverso de (a), (b), (c) ou (d) de acordo com a presente descrição.

Em uma modalidade específica, o produto isolado inclui uma enzima, uma proteína nutricional, uma proteína estrutural, um aminoácido, um lipídeo, um ácido graxo, um polissacarídeo, um açúcar, um álcool, uma fibra, um flavonóide, um alcalóide, um carotenóide, um propanóide, um esteróide, um pigmento, uma vitamina e um hormônio de planta.

As modalidades da presente invenção se referem ainda a produtos isolados obtidos através da expressão de um ácido nucléico isolado que contém uma sequência de nucleotídeos que inclui:

(a) uma sequência de nucleotídeos das SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 ou um fragmento ou um domínio da mesma;

(b) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo de qualquer uma das SEQ ID Nºs: 2, 4, 6, 8, 10 ou um fragmento ou um domínio da mesma;

(c) uma sequência de nucleotídeos que possui similaridade substancial a (a) ou (b);

(d) uma sequência de nucleotídeos capaz de se hibridizar com (a) ou (b);

(e) uma sequência de nucleotídeos complementar a (a), (b), (c) ou (d); ou

(f) uma sequência de nucleotídeos que é o complemento inverso de (a), (b) (c) ou (d) de acordo com a presente descrição.

Em uma modalidade específica, o produto é obtido em uma

planta. Em uma outra modalidade específica, o produto é obtido em cultura de células. Em uma outra modalidade específica, o produto é obtido em um sistema isento de células. Em uma outra modalidade específica, o produto inclui uma enzima, uma proteína nutricional, uma proteína estrutural, um aminoácido, um lipídeo, um ácido graxo, um polissacarídeo, um açúcar, um álcool, uma fibra, um flavonóide, um alcalóide, um carotenóide, um propanóide, um esteróide, um pigmento, uma vitamina e um hormônio de planta.

Em uma modalidade, o produto é uma ubiquitina E3 ligase do tipo RING. Em uma modalidade específica, o produto é um polipeptídeo que contém uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID Nºs: 2, 4, 6, 8, 10.

As modalidades da presente invenção referem-se ainda a um polinucleotídeo isolado que inclui uma sequência de nucleotídeos de pelo menos 10 bases, cuja sequência é idêntica, complementar ou substancialmente similar a uma região de qualquer sequência das SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 e em que o polinucleotídeo é adaptado para qualquer um de vários usos.

Em uma modalidade específica, o polinucleotídeo é utilizado como um marcador cromossômico. Em uma outra modalidade específica, o polinucleotídeo é utilizado como um marcador para análise de RFLP. Em uma outra modalidade específica, o polinucleotídeo é utilizado como um marcador para o cruzamento ligado às características quantitativas. Em uma outra modalidade específica, o polinucleotídeo é utilizado como um marcador para o cruzamento auxiliado por marcadores. Em uma outra modalidade específica, o polinucleotídeo é utilizado como uma sequência de isca em um sistema de dois híbridos para identificar sequências que codificam polipeptídeos que interagem com o polipeptídeo codificado pela sequência de isca. Em uma outra modalidade específica, o polinucleotídeo é utilizado como um indicador para diagnóstico para a genotipagem ou para a identificação de um indivíduo ou de uma população de indivíduos. Em uma outra modalidade específica, o polinucleotídeo é utilizado para análise genética para identificar limites de genes ou éxons.

As modalidades da presente invenção se referem ainda a um vetor de expressão que compreende ou que consiste em uma molécula de ácido nucléico que inclui:

(a) um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo que é listado em qualquer uma das SEQ ID Nºs: 2, 4, 6, 8, 10 ou

(b) um fragmento, um ou mais domínios ou regiões características de qualquer uma das SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9; ou

(c) uma sequência completa de ácido nucléico listada em qualquer uma das SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 ou um fragmento da mesma, em combinação com uma sequência heteróloga.

Em uma modalidade específica, o vetor de expressão inclui um ou mais elementos tal como, por exemplo, mas não limitados a uma sequência intensificadora do promotor, uma sequência marcadora para seleção, uma origem de replicação, uma sequência que codifica uma marcação de epítopo ou uma sequência que codifica uma marcação para purificação por afinidade. Em uma modalidade mais específica, a sequência intensificadora do promotor pode ser, por exemplo, o promotor 35S do CaMV, o promotor 19S do CaMV, o promotor PR-1a do tabaco, a ubiquitina e o promotor da faseolina. Em uma outra modalidade, o promotor é operacional em plantas e mais especificamente, é um promotor constitutivo ou que pode ser induzido. Em uma outra modalidade específica, a sequência marcadora para seleção codifica um gene de resistência a antibiótico. Em uma outra modalidade específica, a sequência de marcação de epítopo codifica V5, o peptídeo Phe-His-His-Thr-Thr, hemaglutinina ou glutationa-S-transferase. Em uma outra modalidade específica, a sequência de marcação para purificação por afinidade codifica uma sequência de poliaminoácidos ou um polipeptídeo. Em uma modalidade mais específica, a sequência de poliaminoácidos é polihistidina. Em uma modalidade mais específica, o polipeptídeo é o domínio de ligação com a quitina ou glutationa-S-transferase. Em uma modalidade mais específica, a sequência de marcação para purificação por afinidade compreende uma sequência que codifica inteína.

Em uma modalidade específica, o vetor de expressão é um vetor

de expressão eucariótico ou um vetor de expressão procariótico. Em uma modalidade mais específica, o vetor de expressão eucariótico inclui um promotor específico ao tecido. Mais especificamente, o vetor de expressão é operacional em plantas.

As modalidades da presente invenção se referem ainda a uma célula que compreende ou que consiste em um constructo de ácido nucléico que compreende um vetor de expressão e um ácido nucléico que inclui um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo que é listado em qualquer uma das SEQ ID Nºs: 2, 4, 6, 8, 10 ou uma sequência de ácido nucléico listada em qualquer uma das SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 ou um segmento da mesma, em combinação com uma sequência heteróloga.

Em uma modalidade específica, a célula é uma célula de bactéria, uma célula de fungo, uma célula vegetal ou uma célula animal. Em uma modalidade específica, a célula é uma célula vegetal. Em uma modalidade mais específica, o polipeptídeo é expresso em uma localização ou em um tecido específico de uma planta. Em uma modalidade mais específica, a localização ou o tecido pode ser, por exemplo, epiderme, raiz, tecido vascular, meristema, câmbio, córtex, seiva, folha e flor. Em uma modalidade mais específica alternativa, a localização ou o tecido é uma semente. Em uma modalidade específica, o polipeptídeo está envolvido em uma função tal como, por exemplo, metabolismo de carbono, nitrogênio e/ou enxofre, utilização de nitrogênio, assimilação de nitrogênio, fotossíntese, biossíntese de lignina, biossíntese de antocianina, transdução de sinal, crescimento celular, reprodução, resistência a doenças, tolerância a estresse abiótico, composição nutricional, regulação gênica e/ou diferenciação.

As modalidades da presente invenção consideram um polipeptídeo que contém uma sequência de polipeptídeo codificada por um polinucleotídeo isolado contendo uma sequência de nucleotídeos de pelo menos 10 bases, cuja sequência é idêntica, complementar ou substancialmente similar a uma região de qualquer uma das sequências das SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 ou um um fragmento funcional da mesma e em que o polinucleotídeo é adaptado para um uso que inclui:

(a) uso como um marcador cromossômico para identificar a localização do polinucleotídeo correspondente ou complementar em um cromossomo nativo ou artificial;

(b) uso como um marcador para análise de RFLP;

(c) uso como um marcador para cruzamento ligado às características quantitativas;

(d) uso como um marcador para cruzamento auxiliado por marcadores;

(e) uso como uma sequência de isca em um sistema de dois híbridos para identificar sequências que codificam polipeptídeos que interagem com o polipeptídeo codificado pela sequência de isca;

(f) uso como um indicador para diagnóstico para a genotipagem ou para a identificação de um indivíduo ou de uma população de indivíduos; ou

(g) uso para análise genética para identificar limites de genes ou éxons.

A invenção considera ainda um uso de uma molécula de ácido nucléico que compreende uma sequência de nucleotídeos de pelo menos 10 bases, cuja sequência é idêntica, complementar ou substancialmente similar a uma região da SEQ ID Nº: 3 ou um fragmento funcional da mesma e em que o uso é selecionado do grupo que consiste em:

(i) uso como um marcador para baixa capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio;

(ii) uso como um marcador para maior biossíntese de lignina; ou

(iii) uso como um marcador para baixo rendimento.

É também considerado um método de produção de uma planta que compreende uma modificação à mesma, que inclui as etapas de: (1) fornecimento de um ácido nucléico que é um ácido nucléico isolado contendo uma sequência de nucleotídeos que inclui:

(a) uma sequência de nucleotídeos listada como as SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 ou um éxon ou um domínio da mesma;

(b) uma sequência de nucleotídeos que possui similaridade substancial a (a);

(c) uma sequência de nucleotídeos capaz de se hibridizar com (a);

(d) uma sequência de nucleotídeos complementar a (a), (b) ou (c); ou

(e) uma sequência de nucleotídeos que é o complemento inverso de (a), (b) ou (c);

e (2) introdução do ácido nucléico na planta, em que o ácido nucléico pode ser expresso na planta em uma quantidade eficiente para realizar a modificação. Em uma modalidade, a modificação compreende uma característica alterada na planta, em que a característica corresponde ao ácido nucléico introduzido na planta. Em outras modalidades específicas, a característica corresponde a metabolismo de carbono, nitrogênio e/ou enxofre, utilização de nitrogênio, assimilação de nitrogênio, fotossíntese, biossíntese de lignina, biossíntese de antocianina, transdução de sinal, crescimento celular, reprodução, resistência a doenças, tolerância a estresse abiótico, composição nutricional, regulação gênica e/ou diferenciação.

Em uma outra modalidade, a modificação inclui uma expressão ou um acúmulo maior ou menor de um produto da planta. Especificamente, o produto é um produto natural da planta. Equivalentemente especificamente, o produto é um produto novo ou alterado da planta. Especificamente, o produto compreende uma ubiquitina E3 ligase similar a RING.

É também abrangido dentro da invenção descrita agora um método de produção de uma proteína recombinante, que compreende as etapas de:

(a) crescimento das células recombinantes que compreendem um constructo de ácido nucléico sob condições de crescimento adequadas, o constructo compreendendo um vetor de expressão e um ácido nucléico incluindo: um ácido nucléico que codifica uma proteína que é listada nas SEQ ID Nºs: 2, 4, 6, 8, 10 ou uma sequência de ácido nucléico listada nas SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 ou segmentos da mesma; e

(b) isolamento das células recombinantes da proteína recombinante expressa pelas mesmas.

As modalidades da presente invenção fornecem um método de

produção de uma proteína recombinante em que o vetor de expressão inclui um ou mais elementos que incluem uma sequência intensificadora do promotor, uma sequência marcadora para seleção, uma origem de replicação, uma sequência que codifica uma marcação de epítopo e uma sequência que codifica uma marcação para purificação por afinidade. Em uma modalidade específica, o constructo de ácido nucléico inclui uma sequência que codifica uma marcação de epítopo e a etapa de isolamento inclui o uso de um anticorpo específico para a marcação de epítopo. Em uma outra modalidade específica, o constructo de ácido nucléico contém uma sequência que codifica o poliaminoácido e a etapa de isolamento inclui o uso de uma resina que compreende uma substância que se liga ao poliaminoácido, especificamente quando o poliaminoácido for polihistidina e a resina que se liga ao poliamino for resina de agarose carregada com níquel. Ainda em uma outra modalidade específica, o constructo de ácido nucléico contém uma sequência que codifica o polipeptídeo e a etapa de isolamento inclui o uso de uma resina que contém uma substância que se liga ao polipeptídeo, especificamente quando polipeptídeo for um domínio de ligação com a quitina e a resina contiver quitina-sepharose.

As modalidades da presente invenção se referem ainda a uma planta modificada por um método que inclui a introdução em uma planta de um ácido nucléico em que o ácido nucléico pode ser expresso na planta em uma quantidade eficiente para realizar a modificação. A modificação pode ser, por exemplo, metabolismo de carbono, nitrogênio e/ou enxofre, utilização de nitrogênio, assimilação de nitrogênio, fotossíntese, biossíntese de lignina, biossíntese de antocianina, transdução de sinal, crescimento celular, reprodução, resistência a doenças, tolerância a estresse abiótico, composição nutricional, regulação gênica e/ou diferenciação. Em uma modalidade, a planta modificada possui maior ou menor resistência a um herbicida, a um estresse ou a um agente patogênico. Em uma outra modalidade, a planta modificada possui maior ou menor necessidade de luz, água, nitrogênio ou elementos traços. Ainda em uma outra modalidade, a planta modificada é enriquecida em relação a um aminoácido essencial como uma proporção de

uma fração de proteína da planta. A fração de proteína pode, por exemplo, ser proteína total da semente, proteína solúvel, proteína insolúvel, proteína que pode ser extraída em água e proteína associada a lipídeos. Ainda em uma outra modalidade, a planta modificada possui maior ou menor pigmentação de antocianina. Ainda em uma outra modalidade, a planta modificada possui maior ou menor acúmulo de lignina. Ainda em uma outra modalidade, a planta possui maior sensibilidade a condições de limitação de nitrogênio no solo. A modificação pode incluir superexpressão, subexpressão, modulação antissenso, supressão senso, expressão que pode ser induzida, repressão que pode ser induzida ou modulação de um gene que pode ser induzida.

A invenção refere-se ainda a uma semente de uma planta modificada ou a um produto isolado de uma planta modificada, em que o produto pode ser uma enzima, uma proteína nutricional, uma proteína estrutural, um aminoácido, um lipídeo, um ácido graxo, um polissacarídeo, um açúcar, um álcool, uma fibra, um flavonóide, um alcalóide, um carotenóide, um propanóide, um esteróide, um pigmento, uma vitamina e um hormônio de planta.

O Sumário da Invenção acima lista várias modalidades da invenção e, em muitos casos, lista variações e substituições destas modalidades. O Sumário é meramente um exemplo de inúmeras e de modalidades variadas. A menção de uma ou mais características específicas de uma certa modalidade é similarmente um exemplo. Tal modalidade pode tipicamente existir com ou sem a(s) característica(s) mencionada(s); similarmente, tais características podem ser aplicadas a outras modalidades da invenção, estejam estas listadas neste Sumário ou não. Para evitar uma repetição excessiva, este Sumário não lista ou sugere todas as combinações possíveis de tais características.

Com a finalidade de resumir a invenção e as vantagens atingidas em relação à arte anterior, foram descritos acima certos objetivos e vantagens da invenção. Evidentemente, deve ser entendido que não necessariamente todos os tais objetivos ou vantagens podem ser atingidos de acordo com qualquer modalidade particular da invenção. Assim, por exemplo, os

versados na técnica reconhecerão que a invenção pode ser incorporada ou realizada de uma maneira que atinja ou que otimize uma vantagem ou um grupo de vantagens como ensinado aqui sem necessariamente atingir outros objetivos ou vantagens como pode ser ensinado ou sugerido aqui.

Aspectos, características e vantagens adicionais desta invenção se tornarão evidentes partindo da descrição detalhada das modalidades específicas a seguir. Deve ser entendido, entretanto, que a descrição detalhada e os exemplos específicos embora indiquem as modalidades preferidas da invenção são fornecidos apenas com a finalidade de ilustração, uma vez que várias alterações e modificações dentro do espírito e do âmbito da invenção se tornarão evidentes para os versados na técnica partindo desta descrição detalhada.

Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 é uma série de fotografias que ilustram o fenótipo de senescência precoce induzido pelo baixo teor de nitrogênio em mutantes *lines*. Plantas do tipo selvagem (Columbia, Col) e *lines* foram cultivadas em solo LB2 com 1, 3 ou 10 mM de nitrato, respectivamente, durante 18 dias **(A)**, 26 dias **(B)** e 32 dias **(C)**, exibindo o fenótipo de senescência precoce nas plantas *lines* que receberam suprimento de 1 ou 3 mM de nitrato. DAG: dias após a germinação das sementes. As setas indicam as síliquas mortas. **(D) e (E)** eram folhas do caule e síliquas em desenvolvimento das plantas *lines* (painel superior) e Col (painel inferior) que receberam suprimento de 3 mM de nitrato, respectivamente. A seta em **(E)** indica a extremidade da síliqua em senescência. O fornecimento às plantas *lines* em senescência de 15 mM de nitrato interrompeu o progresso da senescência nas plantas *lines* crescidas inicialmente com 1 mM **(F)** ou 3 mM **(G)** de nitrato.

A Figura 2 é uma representação da clonagem baseada no mapa do gene *LINES* e da complementação de mutante *lines*. **(A)** A posição do lócus *LINES* foi definida por dois marcadores SSLP flanqueadores NF21B7 (12 recombinantes) e NT7I23 (6 recombinantes) no braço superior do Cromossomo I. O mapeamento adicional localizou o lócus *LINES* no clone BAC F22D16 flanqueado pelo marcador SSLP 473993 (1 recombinante) e pelo

marcador CAPS SNP247 (1 recombinante). Esta região tem aproximadamente 62,3 kb e continha 21 genes detalhados, dentre os quais a deleção do fragmento de DNA foi detectada apenas no gene gene *At1g02860.* Após a complementação, o teste confirmou que *At1g02860* é o gene *LINES.* **(B)** Com o fornecimento de 3 mM de nitrato, plantas do tipo selvagem e três *lines* transformadas independentemente com o cDNA de *At1g02860* não exibiram fenótipo de senescência precoce quando receberam o fornecimento de 3 mM de nitrato, embora as plantas *lines* transformadas com o vetor *pGEAD* vazio e a própria *lines* exibiam senescência precoce e rápida 26 dias após a germinação das sementes. **(C)** e **(D)** Detecção de várias versões de DNA genômico e cDNA de *At1g02860* em plantas do tipo selvagem, *lines* e *lines* transgênicas através de PCR e RT-PCR, respectivamente.

A Figura 3 é uma análise molecular do gene *LINES.* (A) Sequência de aminoácidos prevista da proteína *LINES* (SEQ ID Nº: 4). Os resíduos deletados na mutação *LINES* estão sublinhados. (B) Esquema da estrutura de *LINES* com SPX e o domínio RING. A maior parte do domínio RING é deletada na *LINES* truncada. (C) Análise filogenética de ortólogos de *LINES* que contêm tanto SPX quanto o domínio RING.

A Figura 4 é uma comparação da aquisição de nitrogênio e do processo de senescência em plantas *lines* e Col cultivadas sob suprimento limitado de nitrogênio. **(A)** Porcentagem do teor total de nitrogênio (p/p) nos galhos 18 dias após a germinação das sementes (DAG). Os valores são média ± erro padrão (n=3). **(B)** Expressão dos dois genes transportadores de nitrato principais *NRT1.1* e *NRT2.1* em raízes de *lines* e Col 20 DAG. **(C)** Progresso da senescência nas folhas da roseta das plantas *lines* e Col 26 DAG (painel superior) e 32 DAG (painel inferior). As fotografias mostram folhas representativas em cada posição na roseta. **(D)** O padrão de expressão de *SAG12*m o gene marcador de senescência, em plantas *lines* e outros.

A Figura 5 é uma análise do teor de metabólitos de nitrogênio e carbono assim como das quantidades de antocianina nas plantas *lines* e Col cultivadas sob fornecimento de nitrogênio limitado alterados com o processo de senescência. Os metabólitos analisados incluem **(A)** nitrato; **(B)** aminoá-

cidos totais; **(C)** proteínas; **(D)** porcentagem total de nitrogênio (p/p); **(E)** glicose; **(F)** frutose; **(G)** sacarose; **(H)** antocianina; **(I)** clorofila. As barras representam valores médioas ± desvio padrão (n = 3-6).

A Figura 6 é a expressão de genes relacionados nas plantas *lines* e Col que receberam suprimento de nitrogênio limitado alterada com o progresso da senescência. Os genes analisados incluem os envolvidos na assimilação de nitrogênio (*NR1*, *NR2* e *GS2*), na fotossíntese (*RBCS e CAB1*) e na síntese de antocianina (*CHS*). A expressão de *SGA12* foi utilizada como o indicador para o progresso da senescência.

DEFINIÇÕES

Para esclarecimento, certos termos utilizados no relatório descritivo são definidos e apresentados como a seguir:

"Associadas com / ligadas de forma operacional a" referem-se a duas sequências de ácidos nucléicos que estão relacionadas fisicamente ou funcionalmente. Por exemplo, é dito que um promotor ou uma sequência de DNA reguladora está "associada com" uma sequência de DNA que codifica um RNA ou uma proteína se as duas sequências estiverem ligadas de forma operacional ou situadas de forma que a sequência de DNA reguladora afetará o nível de expressão da sequência de DNA codificadora ou estrutural.

Um "constructo quimérico" é uma sequência de ácido nucléico recombinante em que um promotor ou uma sequência de ácido nucléico reguladora está ligada de forma operacional a ou associada com, uma sequência de ácido nucléico que codifica um mRNA ou que é expressa na forma de uma proteína, de forma que tal sequência de ácido nucléico reguladora seja capaz de regular a transcrição ou a expressão da sequência de ácido nucléico associada. A sequência de ácido nucléico reguladora da construção quimérica não está normalmente ligada de forma operacional à sequência de ácido nucléico associada quando encontrada na natureza.

Um "co-fator" é um reagente natural, tal como uma molécula orgânica ou um íon metálico, necessário em uma reação catalisada por enzima. Um co-fator é, por exemplo, NAD(P), riboflavina (incluindo FAD e FMN), folato, molibdopterina, tiamina, biotina, ácido lipóico, ácido pantotênico e co-

enzima A, S-adenosilmetionina, fosfato piridoxal, ubiquinona, menaquinona. Opcionalmente, um co-fator pode ser regenerado e reutilizado.

Uma "sequência codificadora" é uma sequência de ácido nucléico que é transcrita em RNA tal como mRNA, rRNA, tRNA, snRNA, RNA senso ou RNA antissenso. Especificamente, o RNA é então traduzido em um organismo para produzir uma proteína.

Complementar: "complementar" refere-se a duas sequências de nucleotídeos que compreendem sequências de nucleotídeos antiparalelas capazes de se parearem uma com a outra após a formação de pontes de hidrogênio entre os resíduos de bases complementares nas sequências de nucleotídeos antiparalelas.

Atividade enzimática: significa aqui a capacidade de uma enzima de catalisar a conversão de um substrato em um produto. Um substrato para a enzima compreende o substrato natural da enzima, mas compreende ainda análogos do substrato natural, que também podem ser convertidos, pela enzima em um produto ou em um análogo de um produto. A atividade da enzima é medida, por exemplo, através da determinação da quantidade de produto na reação após um certo período de tempo ou através da determinação da quantidade de substrato que permanece na mistura de reação após um certo período de tempo. A atividade da enzima é também medida através da determinação da quantidade de um co-fator não utilizado da reação que permanece na mistura de reação após um certo período de tempo ou através da determinação da quantidade de um co-fator utilizado na mistura de reação após um certo período de tempo. A atividade da enzima também é medida através da determinação da quantidade de um doador de energia livre ou de uma molécula rica em energia (por exemplo, ATP, fosfoenolpiruvato, fosfato de acetila ou fosfocreatina) que permanece na mistura de reação após um certo período de tempo ou através da determinação da quantidade de um doador utilizado de energia livre ou de uma molécula rica em energia (por exemplo, ADP, piruvato, acetato ou creatina) na mistura de reação após um certo período de tempo.

Cassete de expressão: "Cassete de expressão" como utilizado

aqui significa uma molécula de ácido nucléico capaz de direcionar a expressão de uma sequência de nucleotídeos particular em uma célula hospedeira apropriada, que compreende um promotor ligado de forma operacional à sequência de nucleotídeos de interesse que está ligado de forma operacional a sinais de término. Esta compreende ainda tipicamente sequências necessárias para a tradução apropriada da sequência de nucleotídeos. A região codificadora geralmente codifica uma proteína de interesse, mas pode também codificar um RNA funcional de interesse, por exemplo, RNA antissenso ou um RNA não traduzido, na direção senso ou antissenso. O cassete de expressão que compreende a sequência de nucleotídeos de interesse pode ser quimérico, significando que pelo menos um de seus componentes é heterólogo em relação a pelo menos um de seus outros componentes. O cassete de expressão também pode ser um que ocorre naturalmente, mas que foi obtido em uma forma recombinante útil para a expressão heteróloga. Tipicamente, entretanto, o cassete de expressão é heterólogo em relação ao hospedeiro, isto é, a sequência de DNA particular do cassete de expressão não ocorre naturalmente na célula hospedeira e tem que ser introduzida na célula hospedeira ou em um ancestral da célula hospedeira através de um evento de transformação. A expressão da sequência de nucleotídeos no cassete de expressão pode estar sob o controle de um promotor constitutivo ou de um promotor que pode ser induzido que inicia a transcrição apenas quando a célula hospedeira é exposta a algum estímulo externo particular. No caso de um organismo multicelular, tal como uma planta, o promotor também pode ser específico a um tecido ou um órgão ou um estágio do desenvolvimento particular.

O termo "fragmento funcional" como utilizado aqui em relação a uma sequência de ácido nucléico ou de proteína significa um fragmento ou uma parte de uma sequência que mantém a função da sequência de comprimento completo.

Gene: o termo "gene" é utilizado amplamente para se referir a qualquer segmento de DNA associado a uma função biológica. Assim, os genes incluem sequências codificadoras e/ou as sequências reguladoras

necessárias para a sua expressão. Os genes incluem ainda segmentos de DNA não expressos que, por exemplo, formam sequências de reconhecimento para outras proteínas. Os genes podem ser obtidos partindo de uma variedade de fontes, incluindo a clonagem partindo de uma fonte de interesse ou a síntese partindo de informação de sequência conhecida ou prevista e podem incluir sequências planejadas para possuírem os parâmetros desejados.

Heterólogo(a)/exógeno(a): Os termos "heterólogo(a)" e "exógeno(a)" quando utilizados aqui para se referirem a uma sequência de ácido nucléico (por exemplo, uma sequência de DNA) ou um gene, referem-se a uma sequência que se origina de uma fonte estranha à célula hospedeira particular ou, se for proveniente da mesma fonte, é modificada partindo de sua forma original. Assim, um gene heterólogo em uma célula hospedeira inclui um gene que é endógeno à célula hospedeira particular, mas foi modificado, por exemplo, através do uso do embaralhamento do DNA. Os termos incluem ainda várias cópias que não ocorrem naturalmente de uma sequência de DNA que ocorre naturalmente. Assim, os termos se referem a um segmento de DNA que é estranho ou heterólogo à célula ou homólogo à célula, mas em uma posição dentro do ácido nucléico da célula hospedeira em que o elemento não é encontrado normalmente. Os segmentos de DNA exógenos são expressos para produzir polipeptídeos exógenos.

Uma sequência de ácido nucléico "homóloga" (por exemplo, de DNA) é uma sequência de ácido nucléico (por exemplo, de DNA) associada naturalmente a uma célula hospedeira na qual foi introduzida.

Hibridização: A expressão "se hibridiza especificamente com" refere-se à ligação, à formação de dúpléx ou à hibridização de uma molécula apenas com uma sequência de nucleotídeos particular sob condições estringentes quando tal sequência está presente em uma mistura complexa (por exemplo, celular total) DNA ou RNA. "Se liga(m) substancialmente" refere-se à hibridização complementar entre ácido nucléico de sonda e um ácido nucléico alvo e admite pequenas combinações erradas que podem ser acomodadas através da redução da estringência do meio de hibridização para atin-

gir a detecção desejada da sequência de ácido nucléico alvo.

Inibidor: uma substância química que inativa a atividade enzimática de uma proteína tal como uma enzima biossintética, um receptor, uma proteína de transdução de sinal, um produto gênico estrutural ou uma proteína de transporte. O termo "herbicida" (ou "composto herbicida") é utilizado aqui para definir um inibidor aplicado em uma planta em qualquer estágio do desenvolvimento, através do que o herbicida inibe o crescimento da planta ou mata a planta.

Interação: qualidade ou situação de ação mútua de forma que a eficiência ou a toxicidade de uma proteína ou de um composto sobre uma outra proteína é inibidora (antagonistas) ou intensificadora (agonistas).

Uma sequência de ácido nucléico é "isocodificadora com" uma sequência de ácido nucléico de referência quando a sequência de ácido nucléico codifica um polipeptídeo que possui a mesma sequência de aminoácidos que o polipeptídeo codificado pela sequência de ácido nucléico de referência.

Isogênicas: plantas que são geneticamente idênticas, exceto pelo fato de que podem diferir em relação à presença ou à ausência de uma sequência de DNA heteróloga.

Isolada: no contexto da presente invenção, uma molécula de DNA isolada ou uma enzima isolada é uma molécula de DNA ou uma enzima que, através de intervenção humana, existe fora de seu ambiente nativo e não é, portanto, um produto da natureza. Uma molécula de DNA ou uma enzima isolada pode existir em uma forma purificada ou pode existir em um ambiente não nativo tal como, por exemplo, em uma célula hospedeira transgênica.

Proteína madura: proteína da qual o peptídeo de trânsito, o peptídeo sinal e/ou partes do pró-peptídeo foram removidas.

Promotor Mínimo: o menor pedaço de um promotor, tal como um elemento TATA, que pode sustentar qualquer transcrição. Um promotor mínimo possui tipicamente atividade promotora enormemente reduzida na ausência de ativação a montante. Na presença de um fator de transcrição ade-

quado, o promotor mínimo funciona para permitir a transcrição.

Atividade Enzimática Modificada: atividade enzimática diferente daquela que ocorre naturalmente em uma planta (isto é, a atividade enzimática que ocorre naturalmente na ausência de manipulação direta ou indireta de tal atividade pelo ser humano), que é tolerante aos inibidores que inibem a atividade enzimática que ocorre naturalmente.

Nativo: refere-se a um gene que está presente no genoma de uma célula vegetal não transformada.

Que ocorre naturalmente: o termo "que ocorre naturalmente" é utilizado para descrever uma coisa que pode ser encontrada na natureza que é distinta da que é produzida artificialmente pelo ser humano. Por exemplo, uma proteína ou uma sequência de nucleotídeos presente em um organismo (incluindo um vírus), que pode ser isolada de uma fonte na natureza e que não foi modificada intencionalmente pelo ser humano no laboratório, é que ocorre naturalmente.

Ácido nucléico: o termo "ácido nucléico" refere-se a desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos e polímeros dos mesmos na forma de filamento simples ou duplo. A não ser que seja especificamente limitado, o termo abrange ácidos nucléicos que contêm análogos conhecidos de nucleotídeos naturais que possuem propriedades de ligação similares às do ácido nucléico de referência e são metabolizados de uma maneira similar à dos nucleotídeos que ocorrem naturalmente. A não ser que seja indicado de outra maneira, uma sequência de ácido nucléico particular também abrange implicitamente variações modificadas de forma conservativa da mesma (por exemplo, substituições de códons degenerados) e sequências complementares e assim como a sequência indicada explicitamente. Especificamente, as substituições de códons degenerados podem ser conseguidas através de produção de sequências em que a terceira posição de um ou mais códons selecionados (ou todos) é substituída por resíduos de bases misturados e/ou de desoxiinosina (Batzer e outros, Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka e outros, J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); Rossolini e outros, Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994)). Os termos "ácido nucléico" ou "sequência de

ácido nucléico" também podem ser utilizados de forma intercambiável com gene, cDNA e mRNA codificado por um gene.

"ORF" significa quadro aberto de leitura.

Porcentagem de identidade: as expressões "porcentagem de identidade" ou "porcentagem idêntica", no contexto de duas sequências de ácidos nucléicos ou de proteínas, referem-se a duas ou mais sequências ou subsequências que possuem, por exemplo, 60%, especificamente 70%, mais especificamente 80%, ainda mais especificamente 90%, ainda mais especificamente 95% e mais especificamente pelo menos 99% de identidade de resíduos de nucleotídeos ou de aminoácidos, quando comparadas e alinhadas para correspondência máxima, que é medida utilizando um dos algoritmos de comparação de sequências a seguir ou através de inspeção visual. Especificamente, a porcentagem de identidade existe em relação a uma região das sequências que tem pelo menos aproximadamente 50 resíduos de comprimento, mais especificamente ao longo de uma região de pelo menos aproximadamente 100 resíduos e mais especificamente a porcentagem de identidade existe ao longo de pelo menos aproximadamente 150 resíduos. Em uma modalidade especialmente específica, a porcentagem de identidade existe ao longo do comprimento total das regiões codificadoras.

Para a comparação de sequências, tipicamente uma sequência atua como uma sequência de referência à qual as sequências de teste são comparadas. Quando se utiliza um algoritmo de comparação de sequências, as sequências de teste e de referência são inseridas em um computador, as coordenadas das subsequências são determinadas, se necessário, e os parâmetros do programa do algoritmo de sequência são determinados. Um algoritmo de comparação de sequências calcula então a porcentagem de identidade de sequência para a(s) sequência(s) de teste em relação à sequência de referência, com base nos parâmetros do programa determinados.

O alinhamento ótimo das sequências para comparação pode ser realizado, por exemplo, através do algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), através do algoritmo de alinha-

mento por homologia de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), através do método de busca por similaridade de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), através de implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) ou através de inspeção visual (ver, de forma geral, Ausubel e outros, *infra*).

Um exemplo de um algoritmo que é adequado para a determinação da porcentagem de identidade de sequência e da similaridade de sequência é o algoritmo BLAST, que é descrito em Altschul e outros, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). O software para a realização das análises de BLAST está disponível publicamente através do National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Este algoritmo envolve uma primeira identificação de pares de sequências com escore alto (HSPs) através da identificação de palavras curtas de comprimento W na sequência de busca, que se combinam ou satisfazem parte do escore T do limiar com valor positivo quando alinhadas com uma palavra do mesmo comprimento em uma sequência do banco de dados. T é referido como o limiar do escore da palavra da vizinhança (Altschul e outros, 1990). Estas coincidências de palavras iniciais da vizinhança atuam como origens para o início de buscas para encontrar HSPs mais longos que as contêm. As coincidências de palavras são então estendidas em ambas as direções ao longo de cada sequência o mais longe que o escore de alinhamento cumulativo puder ser aumentado. Os escores cumulativos são calculados utilizando, para as sequências de nucleotídeos, os parâmetros M (escore de recompensa para um par de resíduos que combinam; sempre > 0) e N (escore de penalidade para resíduos com combinação errada; sempre < 0). Para as sequências de aminoácidos, é utilizada uma matriz de obtenção de escore para calcular o escore cumulativo. A extensão das coincidências das palavras em cada direção é interrompida quando o escore de alinhamento cumulativo diminui até a quantidade X de seu valor máximo atingido, o escore cumulativo vai a zero ou abaixo disso devido ao acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduos

com escore negativo ou quando o final de qualquer uma das sequências é atingido. Os parâmetros do algoritmo BLAST W, T e X determinam a sensibilidade e a velocidade do alinhamento. O programa BLASTN (para sequências de nucleotídeos) utiliza como valores pré-determinados um comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) de 10, um limite de 100, M=5, N=-4 e uma comparação de ambos os filamentos. Para sequências de aminoácidos, o programa BLASTP utiliza como valores pré-determinados um comprimento de palavra (W) de 3, uma expectativa (E) de 10 e a matriz de obtenção de escore BLOSUM62 (ver Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)).

Em adição ao cálculo da porcentagem de identidade de sequência, o algoritmo BLAST também realiza uma análise estatística da similaridade entre duas sequências (ver, por exemplo, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 (1993)). Uma medida de similaridade fornecida pelo algoritmo BLAST é a menor probabilidade de soma (P(N)), que fornece uma indicação da probabilidade através da qual uma combinação entre duas sequências de nucleotídeos ou de aminoácidos ocorreria ao acaso. Por exemplo, uma sequência de ácido nucléico de teste é considerada similar a uma sequência de referência se a menor probabilidade de soma em uma comparação da sequência de ácido nucléico de teste com a sequência de ácido nucléico de referência for menor que aproximadamente 0,1, mais especificamente menor que aproximadamente 0,01 e mais especificamente menor que aproximadamente 0,001.

Pré-proteína: proteína que é normalmente direcionada para uma organela celular, tal como um cloroplasto e compreende ainda seu peptídeo de trânsito nativo.

Purificado: o termo "purificado(a)" quando aplicado a um ácido nucléico ou a uma proteína, significa que o ácido nucléico ou a proteína está essencialmente livre de outros componentes celulares com os quais está associada no estado natural. Está especificamente em um estado homogêneo, embora possa estar em uma condição seca ou em uma solução aquosa. A pureza e a homogeneidade são tipicamente determinadas utilizando

técnicas de química analítica tal como eletroforese em gel de poliacrilamida ou cromatografia líquida de alto desempenho. Uma proteína que é a espécie predominante presente em uma preparação está substancialmente purificada. O termo "purificado(a)" singifica que um ácido nucléico ou uma proteína dá origem a essencialmente uma banda em um gel eletroforético. Particularmente, isso significa que o ácido nucléico ou a proteína é pelo menos aproximadamente 50% pura, mais especificamente pelo menos aproximadamente 85% pura e mais especificamente pelo menos aproximadamente 99% pura.

Dois ácidos nucléicos são "recombinados" quando as sequências de cada um dos dois ácidos nucléicos são combinadas em um ácido nucléico de progênie. Duas sequências são recombinadas "diretamente" quando ambos os ácidos nucléicos são substratos para recombinação. Duas sequências são "recombinadas indiretamente" quando as sequências são recombinadas utilizando um intermediário tal como um oligonucleotídeo de retrocruzamento. Para a recombinação indireta, não mais de uma das sequências é um substrato real para a recombinação e, em alguns casos, nenhuma das sequências é um substrato para a recombinação.

"Elementos reguladores" referem-se a sequências envolvidas no controle da expressão de uma sequência de nucleotídeos. Os elementos reguladores compreendem um promotor ligado de forma operacional à sequência de nucleotídeos de interesse e sinais de término. Estes abrangem ainda tipicamente sequências necessárias para a tradução apropriada da sequência de nucleotídeos.

Aumento Significativo: um aumento na atividade enzimática que é maior que a margem de erro inerente à técnica de medida, especificamente um aumento de aproximadamente 2 vezes ou mais da atividade da enzima do tipo selvagem na presença do inibidor, mais especificamente um aumento de aproximadamente 5 vezes ou mais e mais especificamente um aumento de aproximadamente 10 vezes ou mais.

Significativamente meNºs: significa que a quantidade de um produto de uma reação enzimática é reduzida mais que a margem de erro ine-

rente à técnica de medida, especificamente uma diminuição de aproximadamente 2 vezes ou mais da atividade da enzima do tipo selvagem na ausência do inibidor, mais especificamente uma diminuição de aproximadamente 5 vezes ou mais e mais especificamente uma diminuição de aproximadamente 10 vezes ou mais.

Ligação Específica/Reatividade Imunológica Cruzada: Uma indicação de que duas sequências de ácidos nucléicos ou proteínas são substancialmente idênticas é que a proteína codificada pelo primeiro ácido nucléico tem reação imunológica cruzada com ou se liga especificamente à proteína codificada pelo segundo ácido nucléico. Assim, uma proteína é tipicamente substancialmente idêntica a uma segunda proteína, por exemplo, quando as duas proteínas diferirem apenas em substituições conservativas. A expressão "se liga especificamente (ou seletivamente) a um anticorpo" ou "especificamente (ou seletivamente) imunorreativo(a) a", quando se refere a uma proteína ou um peptídeo, refere-se a uma reação de ligação que determina a presença da proteína na presença de uma população heterogênea de proteínas e outros compostos biológicos. Assim, sob condições de ensaios imunológicos determinadas, os anticorpos especificados se ligam a uma proteína particular e não se ligam em uma quantidade significativa a outras proteínas presentes na amostra. A ligação específica a um anticorpo sob tais condições pode requerer um anticorpo que é selecionado em relação a sua especificidade para uma proteína particular. Por exemplo, os anticorpos produzidos para a proteína com a sequência de aminoácidos codificada por qualquer uma das sequências de ácidos nucléicos da invenção podem ser selecionados para a obtenção de anticorpos que são especificamente imunorreativos a tal proteína e não a outras proteínas exceto para variações polimórficas. Uma variedade de formatos de ensaios imunológicos pode ser utilizada para selecionar anticorpos especificamente imunorreativos a uma proteína particular. Por exemplo, ensaios imunológicos de ELISA em fase sólida, Western blots ou imunohistoquímica é utilizada de forma rotineira para selecionar anticorpos monoclonais especificamente imunorreativos a uma proteína. Ver Harlow e Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold

Spring Harbor Publications, Nova York "Harlow and Lane", para uma descrição de formatos e condições de ensaios imunológicos que podem ser utilizados para determinar a imunorreatividade específica. Tipicamente, uma reação específica ou seletiva terá pelo menos o dobro de sinal de fundo ou de ruído e mais tipicamente um fundo de mais de 10 até 100 vezes.

"Condições de hibridização estringentes" e "condições de lavagem de hibridização estringentes" no contexto dos experimentos de hibridização de ácidos nucléicos tais como hibridizações de Southern e de Northern são dependentes da sequência e são diferentes sob parâmetros ambientais diferentes. As sequências mais longas se hibridizam especificamente a temperaturas mais altas. Um guia abrangente para a hibridização de ácidos nucléicos é encontrado em Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes parte I capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" Elsevier, Nova York. De forma geral, as condições de hibridização e de lavagem altamente estringentes são selecionadas como sendo aproximadamente 5°C abaixo do ponto de fusão térmico (Tm) para a sequência específica em uma força iônica e um pH definidos. Tipicamente, sob "condições estringentes" uma sonda irá se hibridizar com sua subsequência alvo, mas com nenhuma outra sequência.

A Tm é a temperatura (sob força iônica e pH definidos) em que 50% da sequência alvo se hibridiza com uma sonda combinada perfeitamente. Condições muito estringentes são selecionadas para serem equivalentes à Tm para uma sonda particular. Um exemplo de condições de hibridização estringentes para a hibridização de ácidos nucléicos complementares que possuem mais de 100 resíduos complementares sobre um filtro em um Southern ou Northern blot é 50% de formamida com 1 mg de heparina a 42°C, com a hibridização sendo realizada durante a noite. Um exemplo de condições de lavagem altamente estringentes é 0,15 M de NaCl a 72°C durante aproximadamente 15 minutos. Um exemplo de condições de lavagem estringentes é uma lavagem com 0,2x SSC a 65°C durante 15 minutos (ver, Sambrook, *infra*, para uma descrição do tampão SSC). Frequentemente,

uma lavagem de alta estringência é precedida por uma lavagem de baixa estringência para remover sinal de sonda de fundo. Um exemplo de lavagem de estringência média para um dúpléx de, por exemplo, mais de 100 nucleotídeos, é 1x SSC a 45ºC durante 15 minutos. Um exemplo de lavagem de estringência baixa para um dúpléx de, por exemplo, mais de 100 nucleotídeos, é 4-6x SSC a 40ºC durante 15 minutos. Para sondas curtas (por exemplo, aproximadamente 10 até 50 nucleotídeos), as condições estringentes envolvem tipicamente concentrações de sal menores que aproximadamente 1,0 M de íon Na, tipicamente uma concentração de aproximadamente 0,01 até 1,0 M de íon Na (ou outros sais) em pH 7,0 até 8,3 e a temperatura é tipicamente de pelo menos aproximadamente 30ºC. As condições estringentes também podem ser atingidas com a adição de agentes de desestabilização tal como a formamida. Em geral, uma proporção de sinal em relação a ruído de 2x (ou maior) que a observada para uma sonda não relacionada no ensaio de hibridização particular indica a detecção de uma hibridização específica. Os ácidos nucléicos que não se hibridizam um com o outro sob condições estringentes são ainda substancialmente idênticos se as proteínas que codificarem forem substancialmente idênticas. Isto ocorre, por exemplo, quando uma cópia de um ácido nucléico é criada utilizando a degeneração máxima de códons permitida pelo código genético.

A seguir estão exemplos de conjuntos de condições de hibridização/lavagem que podem ser utilizados para clonar sequências de nucleotídeos que são homólogas das sequências de nucleotídeos de referência da presente invenção: uma sequência de nucleotídeos de referência se hibridiza especificamente com a sequência de nucleotídeos de referência em 7% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,5 M de NaPO4, 1 mM de EDTA a 50°C com lavagem em 2X SSC, 0,1% de SDS a 50°C, de forma mais desejável em 7% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,5 M de NaPO4, 1 mM de EDTA a 50°C com lavagem em 1X SSC, 0,1% de SDS a 50°C, ainda de forma mais desejável em 7% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,5 M de NaPO4, 1 mM de EDTA a 50°C com lavagem em 0,5X SSC, 0,1% de SDS a 50°C, especificamente em 7% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,5 M de NaPO4,

1 mM de EDTA a 50°C com lavagem em 0,1X SSC, 0,1% de SDS a 50°C, mais especificamente em 7% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,5 M de NaPO4, 1 mM de EDTA a 50°C com lavagem em 0,1X SSC, 0,1% de SDS a 65°C.

Uma "subsequência" refere-se a uma sequência de ácidos nucléicos ou de aminoácidos que compreende uma parte de uma sequência mais longa de ácidos nucléicos ou de aminoácidos (por exemplo, proteína) respectivamente.

Similaridade substancial: O termo "similaridade substancial" no contexto de duas sequências de ácidos nucléicos ou de proteínas, refere-se a duas ou mais sequências ou subsequências que são substancialmente similares, por exemplo, que possuem 50%, especificamente 60%, mais especificamente 70%, ainda mais especificamente 80%, ainda mais especificamente 90%, ainda mais especificamente 95% e mais especificamente 99% de identidade de sequência.

Substrato: um substrato é a molécula que uma enzima reconhece naturalmente e converte em um produto na via bioquímica na qual a enzima realiza naturalmente a sua função ou é uma versão modificada da molécula, que também é reconhecida pela enzima e é convertida pela enzima em um produto em uma reação enzimática similar à reação que ocorre naturalmente.

Transformação: um processo para a introdução de DNA heterólogo em uma célula vegetal, um tecido vegetal ou uma planta. É entendido que as células vegetais, o tecido vegetal ou as plantas transformadas ambrangem não somente o produto final de um processo de transformação, mas também a progênie transgênica das mesmas.

"Transformado", "transgênico" e "recombinante" referem-se a um organismo hospedeiro tal como uma bactéria ou uma planta no qual uma molécula de ácido nucléico heteróloga foi introduzida. A molécula de ácido nucléico pode ser integrada de forma estável no genoma do hospedeiro ou a molécula de ácido nucléico também pode estar presente na forma de uma molécula extracromossômica. Tal molécula extracromossômica também po-

de ser autorreplicante. É entendido que as células, os tecidos ou as plantas transformadas abrangem não somente o produto funal de um processo de transformação, mas também a progênie transgênica das mesmas. Um hospedeiro "não transformado", "não transgênico" ou "não recombinante" refere-se a um organismo do tipo selvagem, por exemplo, uma bactéria ou uma planta, que não contém a molécula de ácido nucléico heteróloga.

Viabilidade: "viabilidade" como utilizado aqui refere-se a um parâmetro de aptidão de uma planta. As plantas são analisadas em relação ao seu desempenho homozigoto de desenvolvimento da planta, indicando quais proteínas são essenciais para o crescimento da planta.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. Descrição Geral da Genômica Funcional das Características

O objetivo da genômica funcional é identificar os genes que controlam a expressão de fenótipos do organismo e emprega uma variedade de metodologias, que incluem, mas não estão limitadas a bioinformática, estudos da expressão gênica, interações de genes e produtos gênicos, genética, bioquímica e genética molecular. Por exemplo, a bioinformática pode determinar uma função a um certo gene através da identificação de genes em organismos heterólogos com um grau de similaridade (homologia) no nível de aminoácidos ou de nucleotídeos. A expressão de um gene nos níveis de mRNA ou de proteína pode determinar uma função através da ligação da expressão de um gene a uma resposta ambiental, um processo do desenvolvimento ou uma perturbação da genética (por mutação) ou da genética molecular (superexpressão ou subexpressão do gene). A expressão de um gene no nível de mRNA pode ser verificada isoladamente (análise de Northern) ou em associação com outros genes (análise em microarranjo), enquanto que a expressão de um gene no nível de proteína pode ser verificada isoladamente (análise em gel da proteína nativa ou desnaturada ou por imunoblot) ou em associação com outros genes (análise proteômica). O conhecimento das interações proteína/proteína e proteína/DNA pode determinar uma função através da identificação das proteínas e das sequências de ácidos nucléicos que atuam juntas no mesmo processo biológico. A genética

pode determinar uma função a um gene através da demonstração de que lesões no DNA (mutações) no gene possuem um efeito que pode ser quantificado sobre o organismo, que inclui, mas não é limitado a: seu desenvolvimento; biossíntese e resposta a hormônios; crescimento e hábito de crescimento (arquitetura da planta); perfis de expressão de mRNA; perfis de expressão de proteína; capacidade de resistir a doenças; tolerância a estresses abióticos; capacidade de conseguir nutrientes; eficiência fotossintética; metabolismo primário e secundário alterado; e a composição de vários órgãos da planta. A bioquímica pode determinar uma função através da demonstração de que a proteína codificada pelo gene, tipicamente quando expressa em um organismo heterólogo, possui uma certa atividade enzimática, isoladamente ou em combinação com outras proteínas. A genética molecular pode determinar uma função através da superexpressão ou da subexpressão do gene na planta nativa ou em organismos heterólogos e da observação dos efeitos que podem ser quantificados que são descritos na determinação de funções pela genética anteriormente. Na genômica funcional, qualquer uma ou todas estas abordagens são utilizadas, frequentemente em associação, para atribuir aos genes as funções de qualquer um de um número de fenótipos do organismo.

É reconhecido pelos versados na técnica que estas metodologias diferentes podem cada uma fornecer dados como evidência para a função de um gene particular e que tal evidência é mais forte com o aumento das quantidades de dados utilizados para a determinação de funções: especificamente partindo de uma única metodologia, mais especificamente partindo de duas metodologias e ainda mais especificamente partindo de mais de duas metodologias. Em adição, os versados na técnica estão cientes que metodologias diferentes podem diferir em relação à força da evidência para a determinação da função de um gene. Tipicamente, mas nem sempre, um dado de uma evidência bioquímica, genética ou de genética molecular é considerado mais forte que um dado de uma evidência proveniente da bioinformática ou da expressão gênica. Finalmente, os versados na técnica reconhecem que, para genes diferentes, um único dado proveniente de uma úni-

ca metodologia pode diferir em termos da força da evidência fornecida por cada dado distinto para a determinação da função destes genes diferentes.

O objetivo da genômica funcional de características de espécies para silvicultura é identificar os genes das características, isto é, os genes capazes de conferir características úteis em plantas de florestamento. Tais características incluem, mas não estão limitadas a: maior rendimento, seja em quantidade ou em qualidade; maior aquisição de nutrientes e maior eficiência metabólica; composição de nutrientes melhorada ou alterada de tecidos de plantas utilizados para construção, fibra ou processamento; maior utilidade para processamento industrial; maior resistência a doenças de plantas; maior tolerância a condições ambientais adversas (estresses abióticos) incluindo, mas não limitadas à seca, ao frio excessivo, ao calor excessivo ou à salinidade excessiva do solo ou à acidez ou à alcalinidade extrema; e alterações na arquitetura ou no desenvolvimento da planta, incluindo alterações no ritmo do desenvolvimento. A implantação de tais genes de características identificados através de meios transgênicos ou não transgênicos poderia melhorar substancialmente as plantas de florestamento para o benefício da silviculura.

O objetivo da genômica funcional das características das plantas de cultivo é identificar os genes das características das plantas de cultivo, isto é, genes capazes de conferir características agronômicas úteis em plantas de cultivo. Tais características agronômicas incluem, mas não estão limitadas a: maior rendimento, seja em quantidade ou em qualidade; maior aquisição de nutrientes e maior eficiência metabólica; composição de nutrientes melhorada ou alterada dos tecidos de plantas utilizados para alimentação, produto alimentício, fibra ou processamento; maior utilidade para processamento agrícola ou industrial; maior resistência a doenças de plantas; maior tolerância a condições ambientais adversas (estresses abióticos) incluindo, mas não limitadas à seca, ao frio excessivo, ao calor excessivo ou à salinidade excessiva do solo ou à acidez ou à alcalinidade extrema; e alterações na arquitetura ou no desenvolvimento da planta, incluindo alterações no ritmo do desenvolvimento. A implantação de tais genes de características

identificados através de meios transgênicos ou não transgênicos poderia melhorar substancialmente as plantas de cultivo para o benefício da agricultura.

Os cereais são as plantas de cultivo mais importantes no planeta, em termos de consumo tanto humano quanto animal. A sintenia genômica (conservação da ordem dos genes dentro de segmentos cromossômicos grandes) é observada no arroz, no milho, no trigo, na cevada, no centeio, na aveia e em outras monocotiledôneas importantes para a agricultura, que facilita o mapeamento e o isolamento de genes ortólogos de várias espécies de cereais com base na sequência de um único gene de cereal. O arroz possui o menor genoma (~ 420 Mb) entre os grãos de cereais e foi recentemente um foco principal de esforços de sequênciamento genômico e de ESTs públicos e privados.

Para identificar os genes das características das plantas de cultivo no genoma do arroz [trigo] de controle [característica], os genes da sequência genômica de esboço do arroz [bancos de dados de ESTs de trigo] foram priorizados com base em uma ou mais metodologias genômicas funcionais. Por exemplo, estudos de expressão ao longo de todo o genoma de plantas de arroz infectadas com o fungo causador de brusone do arroz (*Magnaporthe grisea*) foram utilizados para priorizar genes candidatos que controlam a resistência a doenças. cDNAs de comprimento completo e parciais de candidatos de genes das características do arroz poderiam então ser previstos com base na análise da sequência do genoma inteiro do arroz e isolados através do planejamento e da utilização de iniciadores para a amplificação através da PCR utilizando um programa de escolha dos iniciadores da PCR disponível comercialmente. Os iniciadores foram utilizados para a amplificação através da PCR de cDNAs de comprimento completo ou parciais de bibliotecas de cDNA ou de cDNA de primeiro filamento de arroz. Os clones de cDNA que resultam de qualquer uma das abordagens foram utilizados para o constructo de vetores planejados para alterar a expressão destes genes em plantas transgênicas utilizando metodologias de genética molecular, que são descritas em detalhes a seguir. A alteração do fenótipo da

planta através da superexpressão ou da subexpressão de genes das características chaves em plantas transgênicas é um método forte e estabelecido para atribuir funções aos genes de plantas. Os ensaios para a identificação de plantas transgênicas com alterações nas características de interesse devem ser utilizados para atribuir de forma inequivocada a utilidade destes genes para a melhoria do arroz e, por extensão, outros cereais, através de métodos transgênicos ou de cruzamento clássico.

II. Identificação, Clonagem e Sequênciamento dos cDNAs

A clonagem e o sequênciamento dos cDNAs da presente invenção são descritos no Exemplo 1.

Os ácidos nucléicos e as proteínas isolados da presente invenção são úteis para uma faixa de plantas, gimnospermas, monocotiledôneas e dicotiledôneas, em particular monocotiledôneas tais como arroz, trigo, cevada e milho. Em uma modalidade mais específica, a monocotiledônea é um cereal. Em uma modalidade mais específica, o cereal pode ser, por exemplo, milho, trigo, cevada, aveia, centeio, painço, sorgo, triticale, secale, *Trigo einkorn*, espelta, *Trigo emmer*, teff, sorgo, linho, grama, *Tripsacum* sp. ou teosinte. Em uma modalidade mais específica, o cereal é arroz. Outros gêneros de plantas incluem, mas não estão limitados a *Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Gragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solanum, Petunia, Digitalis, Majorana, Ciahorium, Helianthus, 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.*

A presente invenção fornece ainda um método de genotipagem de uma planta ou de uma parte da planta que compreende uma molécula de ácido nucléico da presente invenção. Opcionalmente, a planta é uma monocotiledônea tal como, mas não limitada a arroz ou trigo. A genotipagem fornece um meio de distinção de homólogos de um par de cromossomos e po-

de ser utilizada para diferenciar segregantes em uma população de plantas. Os métodos com marcadores moleculares podem ser utilizados em estudos filogenéticos, na caracterização de relações genéticas entre variedades de plantas de cultivo, na identificação de cruzamentos ou híbridos somáticos, na localização de segmentos cromossômicos que afetam características monogênicas, na clonagem baseada no mapa e no estudo da herança quantitativa (ver Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual, Capítulo 7, Clark ed., Springer-Verlag, Berlin 1997; Paterson, A.H., "The DNA Revolution", capítulo 2 em Genome Mapping in Plants, Paterson, A.H. ed., Academic Press/R.G. Lands Co., Austin, Texas 1996).

O método de genotipagem pode empregar qualquer número de técnicas analíticas com marcadores moleculares tais como, mas não limitados aos polimorfismos de comprimento de restrição (RFLPs). Como é bem-conhecido na técnica , os RFLPs são produzidos através de diferenças nos comprimentos de fragmentos de restrição do DNA resultantes de diferenças de nucleotídeos entre os alelos do mesmo gene. Assim, a presente invenção fornece um método de acompanhamento da segregação de um gene ou de um ácido nucléico da presente invenção ou de sequências cromossômicas ligadas geneticamente através da utilização da análise de RFLP. As sequências cromossômicas ligadas estão dentro de 50 centiMorgans (50 cM), dentro de 40 ou 30 cM, especificamente dentro de 20 ou 10 cM, mais especificamente dentro de 5, 3, 2 ou 1 cM do ácido nucléico da invenção.

III. Características de Interesse

A presente invenção abrange a identificação e o isolamento de polinucleotídeos que codificam proteínas envolvidas na utilização de nitrogênio, na biossíntese de antocianina e na biossíntese de lignina. A alteração da expressão de genes relacionados a estas características pode ser utilizada para melhorar ou modificar plantas, maderia e/ou grão, quando desejado. Os exemplos descrevem os genes de interesse isolados e os métodos de análise da alteração da expressão e seus efeitos sobre as características da planta.

Um aspecto da presente invenção fornece composições e méto-

dos para alterar (isto é, aumentar ou diminuir) o nível das moléculas de ácidos nucléicos e dos polipeptídeos da presente invenção nas plantas. Em particular, as moléculas de ácidos nucléicos e os polipeptídeos da invenção são expressos de forma constitutiva, temporal ou espacial, por exemplo, em estágios do desenvolvimento, em certos tecidos e/ou quantidades, que não são características de plantas não engenheiradas de forma recombinante. Portanto, a presente invenção fornece utilidade em tais exemplos de aplicações para a alteração das características especificadas identificadas anteriormente.

VI. Controle da Expressão Gênica em Plantas Transgênicas

A invenção refere-se ainda a células transformadas que compreendem as moléculas de ácidos nucléicos, plantas, sementes e partes de plantas transformadas e métodos de modificação das características fenotípicas de interesse através da alteração da expressão dos genes da invenção.

A. Modificação de Sequências Codificadoras e Sequências Adjacentes

A expressão transgênica em plantas de genes derivados de fontes heterólogas pode envolver a modificação de tais genes para atingir e otimizar a sua expressão nas plantas. Em particular, os ORFs bacterianos que codificam enzimas separadas, mas que são codificadas pelo mesmo produto da transcrição no microorganismo nativo são melhor expressos nas plantas em produtos da transcrição separados. Para conseguir isso, cada ORF microbiano é individualmente isolado e clonado dentro de um cassete que fornece uma sequência promotora de planta na extremidade a 5' do ORF e um terminador da transcrição de planta na extremidade a 3' do ORF. A sequência do ORF isolado inclui especificamente o códon de iniciação ATG e o códon de término STOP, mas pode incluir uma sequência adicional além do códon de iniciação ATG e do STOP. Em adição, o ORF pode estar truncado, mas ainda manter a atividade necessária; para ORFs particularmente longos, versões truncadas que mantêm a atividade podem ser preferíveis para a expressão em organismos transgênicos. É pretendido que "promotor de planta" e "terminador da transcrição de planta" signifique pro-

motores e terminadores da transcrição que operam dentro das células vegetais. Isto inclui promotores e terminadores da transcrição que podem ser derivados de fontes sem ser vegetais tais como vírus (um exemplo é o Vírus Mosaico da Couve-Flor).

Em alguns casos, a modificação nas sequências codificadoras e na sequência adjacente do ORF não é necessária. É suficiente isolar um fragmento que contém o ORF de interesse e inseri-lo a jusante de um promotor de planta. Por exemplo, Gaffney e outros (Science 261: 754-756 (1993)) expressaram o gene nahG de *Pseudomonas* em plantas transgênicas sob o controle do promotor 35S do CaMV e do terminador tml do CaMV de forma bem-sucedida sem a modificação da sequência codificadora e com os nucleotídeos do gene de *Pseudomonas* a montante do ATG ainda ligados e os nucleotídeos a jusante do códon STOP ainda ligados ao ORF de nahG. Especificamente, a menor sequência microbiana adjacente possível deve ser deixada ligada a montante do ATG e a jusante do códon STOP. Na prática, tal construção pode depender da disponibilidade dos sítios de restrição.

Em outros casos, a expressão de genes derivados de fontes microbianas pode fornecer problemas na expressão. Estes problemas foram bem caracterizados na técnica e são particularmente comuns com genes derivados de certas fontes tal como *Bacillus*. Estes problemas podem se aplicar à sequência de nucleotídeos desta invenção e a modificação destes genes pode ser realizada utilizando técnicas agora bem-conhecidas na técnica . Podem ser encontrados os problemas a seguir:

1. Uso de Códons.

O uso de códons específicos em plantas difere do uso de códons específicos em certos microorganismos. A comparação do uso de códons dentro de um ORF microbiano clonado ao uso em genes de plantas (e, em particular, genes da planta alvo) possibilitará uma identificação dos códons dentro do ORF que devem ser especificamente alterados. Tipicamente a evolução das plantas tendeu em direção a uma forte preferência dos nucleotídeos C e G na terceira posição de base de monocotiledôneas, enquanto as dicotiledôneas frequentemente utilizam os nucleotídeos A ou T nesta

posição. Através da modificação de um gene para incorporar o uso de códons específicos para uma espécie transgênica alvo particular, muitos dos problemas descritos a seguir para o teor de GC/AT e o processamento ilegítimo serão resolvidos.

2. Teor de GC/AT.

Os genes de plantas possuem tipicamente um teor de GC maior que 35%. As sequências dos ORFs que são ricas em nucleotídeos A e T podem causar vários problemas nas plantas. Em primeiro lugar, acredita-se que os motivos de ATTTA causam a desestabilização de mensagens e são observados na extremidade a 3' de muitos mRNAs de vida curta. Em segundo lugar, acredita-se que a ocorrência de sinais de poliadenilação tal como AATAAA em posições inapropriadas dentro da mensagem causam o truncamento prematuro da transcrição. Em adição, as monocotiledôneas podem reconhecer sequências ricas em AT como sítios de processamento (ver abaixo).

3. Sequências Adjacentes à Metionina de Iniciação.

As plantas diferem dos microorganismos no fato de que suas mensagens não possuem um sítio de ligação ao ribossomo específico. Ao invés disso, acredita-se que os ribossomos se ligam à extremidade a 5' da mensagem e procuram pelo primeiro ATG disponível no qual começam a tradução. Todavia, acredita-se que haja uma preferência em relação a certos nucleotídeos adjacentes ao ATG e que a expressão de genes microbianos pode ser aumentada através da inclusão de um iniciador da tradução consenso eucariótico no ATG. A Clontech (catálogo de 1993/1994, página 210, incorporado aqui como referência) sugeriu uma sequência como um iniciador da tradução consenso para a expressão do gene uidA de *E. coli* em plantas. Ainda, Joshi (N.A.R. 15: 6643-6653 (1987), incorporado aqui como referência) comparou muitas sequências de plantas adjacentes ao ATG e sugeriu uma outra sequência consenso. Em situações em que são encontradas dificuldades na expressão de ORFs microbianos em plantas, a inclusão de uma destas sequências no ATG de iniciação pode aumentar a tradução. Em tais casos os últimos três nucleotídeos do consenso podem não ser

apropriados para inclusão na sequência modificada devido a sua modificação do segundo resíduo de AA. As sequências adjacentes específicas à metionina de iniciação podem diferir entre espécies vegetais diferentes. Uma análise de 14 genes de milho localizados no banco de dados do GenBank forneceu os resultados a seguir:

Posição Antes do ATG de Iniciação em 14 Genes de Milho:

	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
	C	38	4	6	2	5	6	0	10	7
	T	30	3	4	3	2	1	1	1	0
	A	23	1	4	3	2	3	7	2	3
	G	63	6	0	6	5	4	6	1	5

Esta análise pode ser realizada para a espécie de planta desejada na qual a sequência de nucleotídeos será incorporada e uma sequência adjacente ao ATG modificada para incorporar os nucleotídeos específicos.

4. Remoção de Sítios de Processamento Ilegítimos.

Os genes clonados partindo de fontes sem ser vegetais e não otimizados para expressão em plantas podem também conter motivos que podem ser reconhecidos em plantas como sítios de processamento a 5' ou a 3' e ser clivados, gerando assim mensagens truncadas ou deletadas. Estes sítios podem ser removidos utilizando as técnicas bem-conhecidas na técnica .

As técnicas para a modificação das sequências codificadoras e das sequências adjacentes são bem-conhecidas na técnica . Nos casos em que a expressão inicial de um ORF microbiano é baixa e é considerado apropriado fazer alterações na sequência como descrito anteriormente, então o constructo de genes sintéticos pode ser realizada de acordo com métodos bem-conhecidos na técnica . Estes são, por exemplo, descritos nas descrições de patentes publicadas EP 0 385 962 (à Monsanto), EP 0 359 472 (à Lubrizol) e WO 93/07278 (à Ciba-Geigy), das quais todas são incorporadas aqui como referência. Na maior parte dos casos é preferível analisar a expressão das construções gênicas utilizando protocolos de ensaios transitórios (que são bem-conhecidos na técnica) antes de sua transferência ára as

plantas transgênicas.

B. Construção de Cassetes de Expressão de Plantas

As sequências codificadoras pretendidas para a expressão em plantas transgênicas são primeiramente montadas em cassetes de expressão atrás de um promotor adequado que pode ser expresso em plantas. Os cassetes de expressão também podem compreender quaisquer sequências adicionais necessárias ou selecionadas para a expressão do transgene. Tais sequências incluem, mas não estão restritas a terminadores da transcrição, sequências externas para aumentar a expressão tais como íntrons, sequências vitais e sequências pretendidas para o direcionamento do produto gênico para organelas e compartimentos celulares específicos. Estes cassetes de expressão podem então ser facilmente transferidos para os vetores de transformação de plantas descritos a seguir. Vem a seguir uma descrição de vários componentes de cassetes de expressão típicos.

1. Promotores

A seleção do promotor utilizado nos cassetes de expressão determinará o padrão de expressão espacial e temporal do transgene na planta transgênica. Os promotores selecionados expressarão os transgenes em tipos de células específicos (tais como células de epiderme da folha, células de mesofilo, células de córtex de raiz) ou em tecidos ou órgãos específicos (raízes, folhas ou flores, por exemplo) e a seleção refletirá a localização desejada do acúmulo do produto gênico. Alternativamente, o promotor selecionado pode controlar a expressão do gene sob várias condições de indução. Os promotores variam em relação a sua força, isto é, a capacidade de promover a transcrição. Dependendo do sistema de células hospedeiras utilizado, qualquer um de um número de promotores adequados pode ser utilizado, incluindo o promotor nativo do gene. A seguir estão os exemplos não limitantes de promotores que podem ser utilizados nos cassetes de expressão.

a. Expressão Constitutiva, o Promotor da Ubiquitina:

A ubiquitina é um produto gênico conhecido por se acumular em muitos tipos de células e seu promotor foi clonado partindo de várias espé-

cies para uso em plantas transgênicas (por exemplo, girassol - Binet e outros Plant Science 79: 87-94 (1991); milho - Christensen e outros Plant Molec. Biol. 12: 619-632 (1989); e *Arabidopsis* - Callis e outros, J. Biol. Chem. 265:12486-12493 (1990) e Norris e outros, Plant Mol. Biol. 21:895-906 (1993)). O promotor da ubiquitina do milho foi desenvolvido em sistemas transgênicos de monocotiledônea e sua sequência e os vetores construídos para a transformação de monocotiledôneas são descritos na publicação de patente EP 0 342 926 (à Lubrizol) que é incorporada aqui como referência. Taylor e outros (Plant Cell Rep. 12: 491-495 (1993)) descrevem um vetor (pAHC25) que compreende o promotor da ubiquitina do milho e o primeiro íntron e sua atividade alta em suspensões de células de várias monocotiledôneas quando introduzido através do bombardeio de microprojéteis. O Arabidopsis promotor da ubiquitina é ideal para uso com as sequências de nucleotídeos da presente invenção. O promotor da ubiquitina é adequado para a expressão gênica em plantas transgênicas, tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas. Os vetores adequados são derivados de pAHC25 ou de qualquer um dos vetores de transformação descritos neste pedido de patente, modificados através da introdução do promotor da ubiquitina e/ou das sequências de íntrons apropriadas.

b. Expressão Constitutiva, o Promotor 35S do CaMV:

A construção do plasmídeo pCGN1761 é descrita no pedido de patente publicado EP 0 392 225 (Exemplo 23), que é incorporado aqui como referência. O pCGN1761 contém o promotor 35S "duplo" do CaMV e o terminador da transcrição tml com um único sítio de EcoRI entre o promotor e o terminador e possui uma estrutura básica do tipo pUC. É construído um derivado do pCGN1761 que possui um poliligante modificado que inclui os sítios NotI e XhoI em adição ao sítio EcoRI existente. Este derivado é denominado pCGN1761ENX. O pCGN1761ENX é útil para a clonagem de sequências de cDNA ou de sequências codificadoras (incluindo sequências de ORFs microbianos) dentro de seu poliligante com a finalidade de expressar as mesmas sob o controle do promotor 35S em plantas transgênicas. O cassete promotor 35S-sequência codificadora-terminador tml inteiro de tal cons-

trução pode ser cortado através dos sítios HindIII, SphI, SalI e XbaI a 5' do promotor e dos sítios XbaI, BamHI e BglI a 3' do terminador para transferir os vetores de transformação tais como os descritos abaixo. Além disso, o fragmento do promotor 35S duplo pode ser removido através do corte a 5' com HindIII, SphI, SalI, XbaI ou PstI e do corte a 3' com qualquer um dos sítio de restrição do poliligante (EcoRI, NotI ou XhoI) para substituição por um outro promotor. Se desejado, as modificações em torno dos sítios de clonagem podem ser feitas através da introdução de sequências que podem aumentar a tradução. Isto é particularmente útil quando a superexpressão é desejada. Por exemplo, o pCGN1761ENX pode ser modificado através da otimização do sítio de iniciação da tradução que é descrito no Exemplo 37 da Patente U.S. Nº 5.639.949, incorporada aqui como referência.

c. Expressão Constitutiva, o Promotor da Actina:

É sabido que várias isoformas da actina são expressas na maior parte dos tipos de células e, consequentemente, o promotor da actina é uma boa escolha para um promotor constitutivo. Em particular, o promotor do gene Actl do arroz foi clonado e caracterizado (McElroy e outros Plant Cell 2: 163-171 (1990)). Foi observado que um fragmento de 1,3 kb do promotor contém todos os elementos reguladores necessários para a expressão em protoplastos de arroz. Além disso, vários vetores de expressão baseados no promotor Actl foram construídos especificamente para uso em monocotiledôneas (McElroy e outros Mol. Gen. Genet. 231: 150-160 (1991)). Estes incorporam o Actl-íntron 1, a sequência flanqueadora a 5' do Adhl e o Adhl-íntron 1 (do gene da álcool desidrogenase do milho) e a sequência do promotor 35S do CaMV. Os vetores que exibiam a expressão mais alta eram fusões de 35S e íntron de Actl ou a sequência flanqueadora a 5' de Actl e o íntron de Actl. A otimização das sequências ao redor do ATG de iniciação (do gene repórter GUS) também aumentou a expressão. Os cassetes de expressão com promotor descritos por McElroy e outros (Mol. Gen. Genet. 231: 150-160 (1991)) podem ser facilmente modificados para a expressão gênica e são particularmente adequados para uso em hospedeiros de monocotiledôneas. Por exemplo, os fragmentos que contêm o promotor são

removidos das construções de McElroy e são utilizados para substituir o promotor 35S duplo no pCGN1761ENX, que fica então disponível para a inserção de sequências gênicas específicas. Os genes de fusão construídos dessa maneira podem então ser transferidos para vetores de transformação apropriados. Em um relato separado, foi observado que o promotor Actl do arroz com seu primeiro íntron direciona uma alta expressão em células de cevada cultivadas (Chibbar e outros Plant Cell Rep. 12: 506-509 (1993)).

d. Expressão Que Pode Ser Induzida, Promotores PR-1:

O promotor 35S duplo no pCGN1761ENX pode ser substituído por qualquer outro promotor de escolha que resultará em níveis de expressão adequadamente altos. Com a finalidade de exemplo, um dos promotores que podem ser regulados quimicamente descritos na Patente U.S. Nº 5.614.395, tal como o promotor PR-1a do tabaco, pode substituir o promotor 35S duplo. Alternativamente, o promotor PR-1 de *Arabidopsis* descrito em Lebel e outros, Plant J. 16:223-233 (1998) pode ser utilizado. O promotor de escolha é cortado especificamente de sua fonte através de enzimas de restrição, mas pode ser alternativamente amplificado através da PCR utilizando iniciadores que carregam sítios de restrição terminais apropriados. Sendo a amplificação através da PCR realizada, o promotor deve ser sequênciado novamente para verificar os erros da amplificação após a clonagem do promotor amplificado no vetor alvo. O promotor PR-1a do tabaco que pode ser regulado quimicamente/pelo agente patogênico é clivado do plasmídeo pCIB1004 (para o constructo, ver o exemplo 21 da EP 0 332 104, que é incorporada aqui como referência) e transferido para o plasmídeo pCGN1761ENX (Uknes e outros, Plant Cell 4: 645-656 (1992)). O pCIB1004 é clivado com NcoI e a ponta coesiva a 3' resultante do fragmento linearizado é tornada cega através do tratamento com T4 DNA polimerase. O fragmento é então clivado com HindIII e o fragmento contendo o promotor PR-1a resultante é purificado em gel e clonado no pCGN1761ENX do qual o promotor 35S duplo foi removido. Isto é feito através da clivagem com XhoI e da obtenção da ponta cega com T4 polimerase, seguidas pela clivagem com HindIII e o isolamento do fragmento maior contendo o terminador do vetor no

qual o promotor do pCIB1004 está clonado. Isto gera um derivado do pCGN1761ENX com o promotor PR-1a e o terminador tml e um poliligante entre estes com sítios únicos de EcoRI e NotI. A sequência codificadora selecionada pode ser inserida neste vetor e os produtos da fusão (isto é, promotor-gene-terminador) podem ser subsequentemente transferidos para qualquer vetor de transformação selecionado, incluindo os descritos *infra*. Vários reguladores químicos podem ser empregados para induzir a expressão da sequência codificadora selecionada nas plantas transformadas de acordo com a presente invenção, incluindo os compostos de benzotiadiazol, ácido isonicotínico ácido salicílico descritos nas Patentes U.S. Nºs 5.523.311 e 5.614.395.

e. Expressão Que Pode Ser Induzida, um Promotor Que Pode Ser Induzido por Etanol:

Um promotor que pode ser induzido por certos alcoóis ou cetonas, tal como etanol, pode ser utilizado para conferir a expressão que pode ser induzida de uma sequência codificadora da presente invenção. Tal promotor é, por exemplo, o promotor do gene alcA de *Aspergillus nidulans* (Caddick e outros (1998) Nat. Biotechnol 16:177-180). Em *A. nidulans*, o gene alcA codifica álcool desidrogenase I, cuja expressão é regulada pelos fatores de transcrição AlcR na presença do indutor químico. Para as finalidades da presente invenção, as sequências codificadoras CAT no plasmídeo palcA:CAT compreendendo a sequência promotora do gene alcA fundida com um promotor 35S mínimo (Caddick e outros (1998) Nat. Biotechnol 16:177-180) são substituídas por uma sequência codificadora da presente invenção para formar um cassete de expressão que possui a sequência codificadora sob o controle do promotor do gene alcA. Isto é realizado utilizando métodos bem-conhecidos na técnica .

f. Expressão Que Pode Ser Induzida, um Promotor Que Pode Ser Induzido por Glucocorticóides:

É também considerada a indução da expressão de uma sequência de ácido nucléico da presente invenção utilizando sistemas baseados em hormônios esteróides. Por exemplo, é utilizado um sistema de indução me-

diada por glucocorticóides (Aoyama e Chua (1997) The Plant Journal 11: 605-612) e a expressão gênica é induzida pela aplicação de um glucocorticóide, por exemplo, um glucocorticóide sintético, especificamente dexametasona, especificamente em uma concentração que varia de 0,1 mM até 1 mM, mais especificamente de 10 mM até 100 mM. Para as finalidades da presente invenção, as sequências do gene da luciferase são substituídas por uma sequência de ácido nucléico da invenção para formar um cassete de expressão que possui uma sequência de ácido nucléico da invenção sob o controle de seis cópias do GAL4 a montante das sequências de ativação fundidas com o promotor 35S mínimo. Isto é realizado utilizando métodos bem-conhecidos na técnica . O fator que atua em trans compreende o domínio de ligação ao DNA de GAL4 (Keegan e outros (1986) Science 231: 699-704) fundido com o domínio de transativação da proteína VP16 do herpesvírus (Triezenberg e outros (1988) Genes Devel. 2: 718-729) fundido com o domínio de ligação ao hormônio do receptor de glucocorticóide de rato (Picard e outros (1988) Cell 54: 1073-1080). A expressão da proteína de fusão é controlada por um promotor conhecido na técnica ou descrito aqui. Este cassete de expressão é também compreendido na planta que compreende uma sequência de ácido nucléico da invenção fundida com 6xGAL4/promotor mínimo. Assim, a especificidade ao órgão ou ao tecido da proteína de fusão é conseguida levando à especificidade ao órgão ou ao tecido da toxina inseticida.

g. Expressão Específica à Raiz:

Um outro padrão de expressão gênica é a expressão na raiz. Um promotor de raiz adequado é o promotor do gene similar a metalotioneína do milho (MML) descrito por de Framond (FEBS 290: 103-106 (1991)) e também na Patente U.S. Nº 5.466.785, incorporados aqui como referência. Este promotor "MTL" é transferido para um vetor adequado tal como pCGN1761ENX para a inserção de um gene selecionado e para a transferência subsequente do cassete promotor-gene-terminador inteiro para um vetor de transformação de interesse.

h. Promotores Que Podem Ser Induzidos por Lesões:

Os promotores que podem ser induzidos por lesões podem ser adequados para a expressão gênica. Vários tais promotores foram descritos (por exemplo, Xu e outros Plant Molec. Biol. 22: 573-588 (1993), Logemann e outros Plant Cell 1: 151-158 (1989), Rohrmeier & Lehle, Plant Molec. Biol. 22: 783-792 (1993), Firek e outros Plant Molec. Biol. 22: 129-142 (1993), Warner e outros Plant J. 3: 191-201 (1993)) e todos são adequados para uso na presente invenção. Logemann e outros descrevem as sequências a montante a 5' de um gene wunI da dicotiledônea batata. Xu e outros mostram que um promotor que pode ser induzido por lesões da dicotiledônea batata (pin2) é ativo na monocotiledônea arroz. Ainda, Rohrmeier & Lehle descrevem a clonagem do cDNA de WipI do milho que é induzido por lesões e que podem ser utilizados para isolar o promotor cognato utilizando técnicas padronizadas. Similarmente, Firek e outros e Warner e outros descreveram um gene induzido por lesões da monocotiledônea *Asparagus officinalis*, que é expresso na lesão local e sítios de invasão de agentes patogênicos. Utilizando técnicas de clonagem bem-conhecidas na técnica , estes promotores podem ser transferidos para vetores adequados, fundidos aos genes que fazem parte desta invenção e utilizados para expressar estes genes nos sítios de lesão da planta.

i. Expressão Específica à Seiva:

O Pedido de Patente WO 93/07278, que é incorporado aqui como referência, descreve o isolamento do gene trpA do milho, que é preferencialmente expresso nas células da seiva. São apresentados a sequência gênica e o promotor se estendendo até -1726 pb do início da transcrição. Utilizando técnicas de biologia molecular padronizadas, este promotor, ou partes do mesmo, pode ser transferido para um vetor tal como pCGN1761 onde pode substituir o promotor 35S e ser utilizado para controlar a expressão de um gene estranho de uma maneira específica à seiva. Na verdade, os fragmentos que contêm o promotor específico à seiva ou partes do mesmo podem ser transferidos para qualquer vetor e modificados para utilidade em plantas transgênicas.

j. Expressão Específica à Folha:

Um gene do milho que codifica fosfoenol carboxilase (PEPC) foi descrito por Hudspeth & Grula (Plant Molec Biol 12: 579-589 (1989)). Utilizando técnicas de biologia molecular padronizadas o promotor para este gene pode ser utilizado para controlar a expressão de qualquer gene de uma maneira específica à folha em plantas transgênicas.

k. Expressão Específica ao Pólen:

A WO 93/07278 descreve o isolamento do gene da proteína quinase dependente de cálcio (CDPK) do milho que é expresso nas células de pólen. A sequência gênica e o promotor se estendem até 1400 pb partindo do início da transcrição. Utilizando técnicas de biologia molecular padronizadas, este promotor, ou partes do mesmo, pode ser transferido para um vetor tal como pCGN1761 onde pode substituir o promotor 35S e pode ser utilizadas para controlar a expressão de uma sequência de ácido nucléico da invenção de uma maneira específica ao pólen.

2. Terminadores da Transcrição

Uma variedade de terminadores da transcrição está disponível para uso nos cassetes de expressão. Estes são responsáveis pelo término da transcrição além do transgene e corrigem a poliadenilação do mRNA. Os terminadores da transcrição apropriados são aqueles que são conhecidos por funcionarem em plantas e incluem o terminador 35S do CaMV, o terminador tml, o terminador da nopalina e o terminador rbcS E9 da ervilha. Estes podem ser utilizados tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas. Em adição, um terminador da transcrição nativo do gene pode ser utilizado.

3. Sequências para o Aumento ou para a Regulação da Expressão

Foi observado que várias sequências aumentam a expressão gênica partindo de dentro da unidade transcricional e estas sequências podem ser utilizadas em associação com os genes desta invenção para aumentar sua expressão em plantas transgênicas.

Foi mostrado que várias sequências de íntrons aumentam a expressão, particularmente em células de monocotiledôneas. Por exemplo, foi observado que os íntrons do gene AdhI do milho aumentam significativamente a expressão do gene do tipo selvagem sob seu promotor cognato

quando introduzidos nas células de milho. Foi observado que o íntron 1 era particularmente eficiente e que aumentava a expressão e constructos de fusão com o gene da cloramfenicol acetiltransferase (Callis e outros, Genes Develop. 1: 1183-1200 (1987)). No mesmo sistema experimental, o íntron do gene bronze 1 do milho tinha um efeito similar no aumento da expressão. As sequências de íntron foram incorporadas de forma rotineira nos vetores de transformação de plantas, tipicamente dentro do líder não traduzido.

Um número de sequências líderes não-traduzidas derivadas de vírus também é conhecido por aumentar a expressão e estas são particularmente eficientes em células de dicotiledôneas. Especificamente, foi mostrado que as sequências líderes do Vírus Mosaico do Tabaco (TMV, a "sequência W"), do Vírus do Mosqueado Clorótico do Milho (MCMV) e do Vírus Mosaico da Alfalfa (AMV) são eficientes no aumento da expressão (por exemplo, Gallie e outros Nucl. Acids Res. 15: 8693-8711 (1987); Skuzeski e outros Plant Molec. Biol. 15: 65-79 (1990)). Outras sequências líderes conhecidas na técnica incluem, mas não estão limitadas a: líderes de picornavírus, por exemplo, líder do EMCV (região não codificadora a 5' de Encefalomiocardite) (Elroy-Stein, O., Fuerst, T. R. e Moss, B. PNAS USA 86:6126-6130 (1989)); líderes de potivírus, por exemplo, líder do TEV (Vírus de Corrosão do Tabaco) (Allison e outros, 1986); líder do MDMV (Vírus Mosaico de Nanismo do Milho); Virology 154:9-20; líder da proteína de ligação à cadeia pesada de imunoglobulina humana (BiP), (Macejak, D. G. e Sarnow, P., Nature 353: 90-94 (1991); líder não traduzido do mRNA da proteína de revestimento do vírus mosaico da alfafa (AMV RNA 4), (Jobling, S. A. e Gehrke, L., Nature 325:622-625 (1987); líder do vírus mosaico do tabaco (TMV), (Gallie, D. R. e outros, Molecular Biology of RNA, páginas 237-256 (1989); e líder do Vírus do Mosqueado Clorótico do Milho (MCMV) (Lommel, S. A. e outros, Virology 81:382-385 (1991)). Ver também, Della-Cioppa e outros, Plant Physiology 84:965-968 (1987).

Em adição à incorporação de um ou mais dos elementos mencionados anteriormente na região reguladora a 5' de um cassete de expressão alvo da invenção, outros elementos peculiares ao cassete de expressão

alvo também podem ser incorporados. Tais elementos incluem, mas não estão limitados a um promotor mínimo. Por promotor mínimo entende-se que os elementos promotores basais são inativos ou quase isso sem a ativação a montante. Tal promotor possui baixa atividade de fundo nas plantas quando não há uma transativador presente ou quando sítios de ligação ao intensificador ou ao elemento de resposta estão ausentes. Um promotor mínimo que é particularmente útil para os genes alvos em plantas é o promotor mínimo Bz1, que é obtido do gene bronze 1 do milho. O promotor central Bz1 é obtido partindo da constructo Bz1-luciferase mutante "myc" pBz1LucR98 através da clivagem no sítio NheI localizado em -53 até -58. Roth e outros, Plant Cell 3: 317 (1991). O fragmento do promotor central Bz1 derivado se estende assim de -53 até +227 e inclui o íntron-1 do Bz1 na região não traduzida a 5'. É também útil para a invenção um promotor mínimo criado através do uso de um elemento TATA sintético. O elemento TATA exibe reconhecimento do promotor através de fatores da RNA polimerase e confere um nível basal de expressão gênica na ausência de ativação (ver, de forma geral, Mukumoto (1993) Plant Mol Biol 23: 995-1003; Green (2000) Trends Biochem Sci 25: 59-63).

4. Direcionamento do Produto Gênico Dentro da Célula

É sabido que há vários mecanismos para o direcionamento de produtos gênicos em plantas e as sequências que controlam o funcionamento destes mecanismos foram caracterizadas em alguns detalhes. Por exemplo, o direcionamento dos produtos gênicos para o cloroplasto é controlado por uma sequência sinal encontrada na extremidade amino terminal de várias proteínas que é clivada durante a importação para o cloroplasto para produzir a proteína madura (por exemplo, Comai e outros J. Biol. Chem. 263: 15104-15109 (1988)). Estas sequências sinal podem ser fundidas com produtos gênicos heterólogos para realizar a importação de produtos heterólogos para o cloroplasto (van den Broeck e outros Nature 313: 358-363 (1985)). O DNA que codifica sequências sinal apropriadas pode ser isolado partindo da sua extremidade a 5' dos cDNAs que codificam a proteína RUBISCO, a proteína CAB, a EPSP sintase enzima, a proteína GS2 e muitas

outras proteínas que são conhecidas como sendo localizadas nos cloroplastos. Ver ainda, a seção intitulada "Expression With Chloroplast Targeting" no Exemplo 37 da Patente U.S. Nº 5.639.949.

Outros produtos gênicos ficam localizados em outras organelas tais como a mitocôndria e o peroxissomo (por exemplo, Unger e outros Plant Molec. Biol. 13: 411-418 (1989)). Os cDNAs que codificam estes produtos também podem ser manipulados para realizar o direcionamento dos produtos gênicos heterólogos a estas organelas. Os exemplos de tais sequências são ATPases codificadas pelo núcleo e isoformas da aspartato amino transferase específicas para as mitocôndrias. O direcionamento dos corpos de proteínas celulares foi descrito por Rogers e outros (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6512-6516 (1985)).

Em adição, foram caracterizadas as sequências que causam o direcionamento dos produtos gênicos a outros compartimentos celulares. As sequências amino terminais são responsáveis pelo direcionamento ao ER, ao apoplasto e pela secreção extracelular de células da aleurona (Koehler & Ho, Plant Cell 2: 769-783 (1990)). Adicionalmente, as sequências amino terminais em associação com as sequências carbóxi terminais são responsáveis pelo direcionamento vacuolar dos produtos gênicos (Shinshi e outros Plant Molec. Biol. 14: 357-368 (1990)).

Através da fusão das sequências de direcionamento apropriadas descritas anteriormente às sequências transgênicas de interesse é possível direcionar o produto transgênico a qualquer organela ou compartimento celular. Para o direcionamento ao cloroplasto, por exemplo, a sequência sinal de cloroplasto do gene RUBISCO, do gene CAB, do gene da EPSP sintase ou do gene GS2 é fundida em quadro com o ATG amino terminal do transgene. A sequência sinal selecionada deve incluir o sítio de clivagem conhecido e a fusão construída deve levar em consideração quaisquer aminoácidos após o sítio de clivagem que são necessários para a clivagem. Em alguns casos, este requerimento pode ser satisfeito através da adição de um pequeno número de aminoácidos entre o sítio de clivagem e o ATG do transgene ou, alternativamente, da substituição de alguns aminoácidos den-

tro da sequência do transgene. As fusões construídas para a importação para o cloroplasto podem ser testadas em relação à eficiência de captação pelo cloroplasto através da tradução *in vitro* de construções transcritas *in vitro* seguida pela captação pelo cloroplasto *in vitro* utilizando técnicas descritas por Bartlett e outros Em: Edelmann e outros (Eds.) Methods in Chloroplast Molecular Biology, Elsevier pp 1081-1091 (1982) e Wasmann e outros Mol. Gen. Genet. 205: 446-453 (1986). Estas técnicas de construção são bem-conhecidas na técnica e podem ser igualmente aplicadas às mitocôndrias e aos peroxissomos.

Os mecanismos descritos anteriormente para o direcionamento celular podem ser utilizados não somente em associação com seus promotores cognatos, mas também em associação com promotores heterólogos de forma a realizar uma finalidade de direcionamento celular específica sob a regulação da transcrição de um promotor que possui um padrão de expressão diferente daquele do promotor do qual o sinal de direcionamento é derivado.

C. Construção de Vetores de Transformação de Plantas

Vários vetores de transformação disponíveis para a transformação de plantas são conhecidos pelos versados comuns nas técnicas de transformação de plantas e os genes pertinetes a esta invenção podem ser utilizados em associação com quaisquer tais vetores. A seleção do vetor dependerá da técnica de transformação específica e da espécie alvo para transformação. Para certas espécies alvo, diferentes marcadores de seleção com antibióticos ou com herbicidas podem ser específicos. Os marcadores de seleção utilizados rotineiramente na transformação incluem o gene nptII, que confere resistência à canamicina e a antibióticos relacionados (Messing & Vierra. Gene 19: 259-268 (1982); Bevan e outros, Nature 304:184-187 (1983)), o gene bar, que confere resistência ao herbicida fosfinotricina (White e outros, Nucl. Acids Res 18: 1062 (1990), Spencer e outros Theor. Appl. Genet 79: 625-631 (1990)), o gene hph, que confere resistência ao antibiótico higromicina (Blochinger & Diggelmann, Mol Cell Biol 4: 2929-2931) e o gene dhfr, que confere resistência ao metatrexato (Bourouis e outros, EMBO

J. 2(7): 1099-1104 (1983)), o gene EPSPS, que confere resistência ao glifosato (Patentes U.S. N°s 4.940.935 e 5.188.642) e o gene da manose-6-fosfato isomerase, que fornece a capacidade de metabolizar a manose (Patentes U.S. N°s 5.767.378 e 5.994.629).

1. Vetores Adequados para a Transformação de *Agrobacterium*

Estão disponíveis muitos vetores para transformação utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. Estes carregam tipicamente pelo menos uma sequência de borda de T-DNA e incluem vetores tal como pBIN19 (Bevan, Nucl. Acids Res. (1984)). A seguir, é descrita o constructo de dois vetores típicos adequados para a transformação de *Agrobacterium*.

a. pCIB200 e pCIB2001:

Os vetores binários pCIB200 e pCIB2001 são utilizados para o constructo de vetores recombinantes para uso com *Agrobacterium* e são construídos da maneira a seguir. O pTJS75kan é criado através da digestão com NarI do pTJS75 (Schmidhauser & Helinski, J. Bacteriol. 164: 446-455 (1985)) permitindo o corte do gene de resistência à tetraciclina, seguida pela inserção de um fragmento de AccI do pUC4K que carrega um NPTII (Messing & Vierra, Gene 19: 259-268 (1982): Bevan e outros, Nature 304: 184-187 (1983): McBride e outros, Plant Molecular Biology 14: 266-276 (1990)). Os ligantes XhoI são ligados ao fragmento de EcoRV do PCIB7 que contém as bordas de T-DNA esquerda e direita, um gene quimérico nos/nptII que pode ser selecionado em planta e o poliligante de pUC (Rothstein e outros, Gene 53: 153-161 (1987)) e o fragmento digerido com XhoI são clonados no pTJS75kan digerido com SalI para criar o pCIB200 (ver também a EP 0 332 104, exemplo 19). O pCIB200 contém os sítios de restrição únicos do poliligante a seguir: EcoRI, SstI, KpnI, BglII, XbaI e SalI. O pCIB2001 é um derivado do pCIB200 criado através da inserção no poliligante de sítios de restrição adicionais. Os sítios de restrição únicos no poliligane do pCIB2001 são EcoRI, SstI, KpnI, BglII, XbaI, SalI, MluI, BclI, AvrII, ApaI, HpaI e StuI. O pCIB2001, em adição ao fato de conter estes sítios de restrição únicos também possui uma seleção em planta e em bactérias com canamicina, bordas de T-DNA esquerda e direita para transformação mediada por *Agrobacteri-*

um, a função trfA derivada de RK2 para mobilização entre *E. coli* e outros hospedeiros e as funções OriT e OriV também de RK2. O poliligante do pCIB2001 é adequado para a clonagem de cassetes de expressão de plantas que contêm seus próprios sinais de regulação.

b. pCIB10 e Derivados de Seleção com Higromicina do Mesmo:

O vetor binário pCIB10 contém um gene que codifica resistência à canamicina para a seleção em plantas e as sequências de T-DNA das bordas direita e esquerda e incorpora as sequências do plasmídeo de faixa ampla de hospedeiros pRK252 que permite que este se replique tanto em *E. coli* quanto em *Agrobacterium*. Sua construção é descrita por Rothstein e outros (Gene 53: 153-161 (1987)). São construídos vários derivados do pCIB10 que incorporam o gene para higromicina B fosfotransferase descrito por Gritz e outros (Gene 25: 179-188 (1983)). Estes derivados possibilitam a seleção de células vegetais transgênicas apenas em higromicina (pCIB743) ou em higromicina e canamicina (pCIB715, pCIB717).

2. Vetores Adequados para Transformação Sem Ser com *Agrobacterium*

A transformação sem o uso de *Agrobacterium tumefaciens* evita a necessidade de sequências de T-DNA no vetor de transformação escolhido e, consequentemente, os vetores que não possuem estas sequências podem ser utilizados em adição aos vetores tais como aqueles descritos anteriormente que contêm sequências de T-DNA. As técnicas de transformação que não se baseiam em *Agrobacterium* incluem a transformação através do bombardeio de partículas, a captação de protoplastos (por exemplo, PEG e eletroporação) e microinjeção. A escolha do vetor depende enormemente da seleção específica em relação à espécie que será transformada. A seguir, é descrita o constructo de vetores típicos adequados para a transformação sem ser com *Agrobacterium*.

a. pCIB3064:

O pCIB3064 é um vetor derivado de pUC adequado para as técnicas de transferência gênica direta em combinação com a seleção através do herbicida basta (ou fosfinotricina). O plasmídeo pCIB246 compreende o promotor 35S do CaMV em fusão operacional como gene GUS de *E. coli* e o

terminador da transcrição 35S do CaMV e é descrito no pedido de patente publicato PCT WO 93/07278. O promotor 35S deste vetor contém duas sequências ATG a 5' do sítio de início. Estes sítios são mutados utilizando técnicas de PCR padronizadas de forma a remover os ATGs e gerar os sítios de restrição SspI e PvuII. Os novos sítios de restrição estão 96 e 37 pb além do sítio único de SalI e 101 e 42 pb além do sítio de início real. O derivado resultante do pCIB246 é denominado pCIB3025. O gene GUS é então cortado do pCIB3025 através da digestão com SalI e SacI, os terminais são tornados cegos e religados para gerar o plasmídeo pCIB3060. O plasmídeo pJIT82 é obtido no John Innes Centre, Norwich e o fragmento de SmaI de 400 pb contendo o gene bar de *Streptomyces viridochromogenes* é cortado e inserido no sítio HpaI do pCIB3060 (Thompson e outros EMBO J 6: 2519-2523 (1987)). Isto gerou o pCIB3064, which compreende o gene bar sob o controle do promotor e do terminador 35S do CaMV para seleção com herbicida, um gene para resistência à ampicilina (para seleção em *E. coli*) e um poliligante com os sítios únicos SphI, PstI, HindIII e BamHI. Este vetor é adequado para a clonagem de cassetes de expressão de plantas contendo seus próprios sinais de regulação.

b. pSOG19 e pSOG35:

O pSOG35 é um vetor de transformação que utiliza o gene da dihidrofolato redutase (DFR) de *E. coli* como um marcador que pode ser selecionado que confere resistência ao metotrexato. A PCR é utilizada para amplificar o promotor 35S (-800 pb), o íntron 6 do gene Adh1 do milho (-550 pb) e 18 pb da sequência líder não traduzida de GUS do pSOG10. Um fragmento de 250 pb que codifica o gene da dihidrofolato redutase do tipo II de *E. coli* é também amplificado através da PCR e estes dois fragmentos da PCR são montados com um fragmento SacI-PstI do pB1221 (Clontech) que compreende a estrutura do vetor pUC19 e o terminador da nopalina sintase. A montagem destes fragmentos gera o pSOG19 que contém o promotor 35S em fusão com a sequência do íntron 6, o líder de GUS, o gene DHFR e o terminador da nopalina sintase. A substituição do líder de GUS no pSOG19 pela sequência líder do Vírus do Mosqueado Clorótico do Milho (MCMV) ge-

ra o vetor pSOG35. O pSOG19 e o pSOG35 carregam o gene de pUC para a resistência à ampicilina e possuem os sítios HindIII, SphI, PstI e EcoRI disponíveis para a clonagem de substâncias estranhas.

3. Vetor Adequado para a Transformação de Cloroplastos

Para a expressão de uma sequência de nucleotídeos da presente invenção em plastídeos de plantas, é utilizado o vetor de transformação de plastídeo pPH143 (WO 97/32011, exemplo 36). A sequência de nucleotídeos é inserida no pPH143 substituindo assim a sequência codificadora PROTOX. Este vetor é então utilizado para a transformação de plastídeos e para a seleção de transformantes em relação à resistência à espectinomicina. Alternativamente, a sequência de nucleotídeos é inserida no pPH143 de forma a substituir o gene aadH. Neste caso, os transformantes são selecionados em relação à resistência aos inibidores de PROTOX.

D. Transformação

Uma vez que uma sequência de ácido nucléico da invenção foi clonada em um sistema de expressão, este é tranformado em uma célula vegetal. Os cassetes de expressão receptores e alvos da presente invenção podem ser introduzidos na célula vegetal em um número de maneiras reconhecidas na técnica . Os métodos para a regeneração de plantas também são conhecidos na técnica . Por exemplo, os vetores do plasmídeo Ti foram utilizados para o fornecimento de DNA estranho, assim como a captação direta de DNA, lipossomos, eletroporação, microinjeção e microprojéteis. Em adição, as bactérias do gênero *Agrobacterium* podem ser utilizadas para transformar as células vegetais. A seguir estão as descrições de técnicas representativas para a transformação de plantas tanto dicotiledôneas quanto monocotiledôneas, assim como uma técnica representativa de transformação de plastídeos.

1. Transformação de Dicotiledôneas

As técnicas de transformação para dicotiledôneas são bem-conhecidas na técnica e incluem técnicas baseadas em *Agrobacterium* e técnicas que não requerem *Agrobacterium*. As técnicas sem ser com *Agrobacterium* envolvem a captação de material genético exógeno diretamente

pelos protoplastos ou pelas células. Isto pode ser realizado através de PEG ou da captação mediada por eletroporação, fornecimento mediado por bombardeio de partículas ou microinjeção. Os exemplos destas técnicas são descritos por Paszkowski e outros, EMBO J 3: 2717-2722 (1984), Potrykus e outros, Mol. Gen. Genet. 199: 169-177 (1985), Reich e outros, Biotechnology 4: 1001-1004 (1986) e Klein e outros, Nature 327: 70-73 (1987). Em cada caso, as células transformadas são regeneradas em plantas inteiras utilizando técnicas padronizadas conhecidas na técnica .

A transformação mediada por *Agrobacterium* é uma técnica específica para a transformação de dicotiledôneas devido a sua alta eficiência de transformação se sua ampla utilidade com muitas espécies diferentes. A transformação por *Agrobacterium* envolve tipicamente a transferência do vetor binário que carrega o DNA estranho de interesse (por exemplo, pCIB200 ou pCIB2001) para uma cepa de *Agrobacterium* apropriada que pode depender dos genes vir carregados pela cepa de *Agrobacterium* hospedeira em um plasmídeo Ti co-residente ou de forma cromossômica (por exemplo, cepa CIB542 para pCIB200 e pCIB2001 (Uknes e outros Plant Cell 5: 159-169 (1993)). A transferência do vetor binário recombinante para *Agrobacterium* é realizada através de um procedimento de cruzamento triparental utilizando *E. coli* que carrega o vetor binário recombinante, uma cepa de *E. coli* auxiliadora que carrega um plasmídeo tal como pRK2013 e que é capaz de mobilizar o vetor binário recombinante para a cepa de *Agrobacterium* alvo. Alternativamente, o vetor binário recombinante pode ser transferido para *Agrobacterium* através da transformação do DNA (Höfgen & Willmitzer, Nucl. Acids Res. 16: 9877 (1988)).

A transformação das espécies de plantas alvo através do *Agrobacterium* recombinante envolve geralmente o co-cultivo de *Agrobacterium* com explantes provenientes da planta e segue protocolos bem-conhecidos na técnica . O tecido transformado é regenerado em meio que pode ser selecionado carregando o marcador de resistência a antibiótico ou a herbicida presente entre as bordas de T-DNA do plasmídeo binário.

Uma outra abordagem para a transformação de células vegetais

com um gene envolve a propulsão de partículas inertes ou biologicamente ativas para os tecidos e para as células vegetais. Esta técnica é descrita nas Patentes U.S. Nºs 4.945.050. 5.036.006 e 5.100.792 todas a Sanford e outros. De forma geral, este procedimento envolve a propulsão de partículas inertes ou biologicamente ativas para as células sob condições eficientes para a penetração na superfície externa da célula e possibilitar a incorporação no interior da mesma. Quando são utilizadas partículas inertes, o vetor pode ser introduzido na célula através do revestimento das partículas com o vetor contendo o gene desejado. Alternativamente, a célula-alvo pode ser circundada pelo vetor de forma que o vetor é carregado para dentro da célula através da partícula. As partículas biologicamente ativas (por exemplo, células de levedura secas, bactéria seca ou um bacteriófago, cada um contendo o DNA que se tenta introduzir) podem também sofrer propulsão para dentro do tecido de células vegetais.

2. Transformação de Monocotiledôneas

A transformação de mais de uma espécie de monocotiledônea se tornou agora rotineira. As técnicas específicas incluem a transferência gênica direta para dentro de protoplastos utilizando PEG ou técnicas de eletroporação e bombardeio de partículas para dentro do tecido de calo. As transformações podem ser realizadas com uma única espécie de DNA ou várias espécies de DNA (isto é, co-transformação) e ambas estas técnicas são adequadas para uso com esta invenção. A co-transformação pode ter a vantagem de evitar o constructo de vetores completos e de gerar plantas transgênicas com loci não ligados para o gene de interesse e o marcador que pode ser selecionado, possibilitando a remoção do marcador que pode ser selecionado nas gerações subsequentes, sendo isto considerado desejável. Entretanto, uma desvantagem do uso da co-transformação é a frequência menor que 100% com a qual espécies de DNA separadas são integradas no genoma (Schocher e outros Biotechnology 4: 1093-1096 (1986)).

Os Pedidos de Patentes EP 0 292 435, EP 0 392 225 e WO 93/07278 descrevem técnicas para a preparação de calo e protoplastos partindo de uma linhagem intracruzada de elite de milho, para a transforma-

ção de protoplastos utilizando PEG ou eletroporação e para a regeneração de plantas de milho partindo de protoplastos transformados. Gordon-Kamm e outros (Plant Cell 2: 603-618 (1990)) e Fromm e outros (Biotechnology 8: 833-839 (1990)) publicaram técnicas para a transformação da linhagem de milho derivada de A188 utilizando o bombardeio de partículas. Além disso, a WO 93/07278 e Koziel e outros (Biotechnology 11: 194-200 (1993)) descrevem técnicas para a transformação de linhagens intracruzadas de elite de milho através do bombardeio de partículas. Esta técnica utiliza embriões imaturos de milho de 1,5-2,5 mm de comprimento cortados de uma espiga de milho 14-15 dias após a polinização e um dispositivo PDS-1000He Biolistics para o bombardeio.

A transformação do arroz também pode ser realizada através de técnicas diretas de transferência gênica utilizando protoplastos ou bombardeio de partículas. A transformação mediada por protoplastos foi descrita para tipos Japonica e tipos Indica (Zhang e outros Plant Cell Rep 7: 379-384 (1988); Shimamoto e outros Nature 338: 274-277 (1989); Datta e outros Biotechnology 8: 736-740 (1990)). Ambos os tipos podem ser transformados de forma rotineira utilizando o bombardeio de partículas (Christou e outros Biotechnology 9: 957-962 (1991)). Além disso, a WO 93/21335 descreve técnicas para a transformação de arroz através de eletroporação.

O Pedido de Patente EP 0 332 581 descreve técnicas para produção, transformação e regeneração de protoplastos de *Pooideae*. Estas técnicas permitem a transformação de *Dactilis* e trigo. Além disso, a transformação do trigo foi descrita por Vasil e outros (Biotechnology 10: 667-674 (1992)) utilizando bombardeio de partículas em células de calo que pode ser regenerado em longo prazo do tipo C e também por Vasil e outros (Biotechnology 11: 1553-1558 (1993)) e Weeks e outros (Plant Physiol. 102: 1077-1084 (1993)) utilizando o bombardeio de partículas de embriões imaturos e calo derivado de embriões imaturos. Uma técnica específica para a transformação de trigo, entretanto, envolve a transformação de trigo através do bombardeio de partículas de embriões imaturos e inclui uma etapa de alto teor de sacarose ou de alto teor de maltose antes do fornecimento do gene.

Antes do bombardeio, qualquer número de embriões (0,75-1 mm de comprimento) é plaqueado em meio MS com 3% de sacarose (Murashiga & Skoog, Physiologia Plantarum 15: 473-497 (1962)) e 3 mg/L de 2,4-D para a indução de embriões somáticos, que é permitido que ocorra na escuridão. No dia escolhido do bombardeio, os embriões são removidos do meio de indução e colocados no meio osmótico (isto é, meio de indução com sacarose ou maltose adicionada na concentração desejada, tipicamente 15%). É permitido que os embriões sofram plasmólise durante 2-3 horas e então são bombardeados. São típicos vinte embriões por placa alvo, embora não sejam críticos. Um plasmídeo que carrega o gene apropriado (tal como pCIB3064 ou pSG35) é precipitado sobre partículas de ouro do tamanho micrométrico utilizando procedimentos padronizados. Cada placa de embriões é atingida com o dispositivo de hélio DuPont Biolistics® utilizando uma pressão de ruptura de ~6,89 MPa (~1000 psi) utilizando uma tela de trama 80 padronizada. Após o bombardeio, os embriões são colocados de volta na escuridão para recuperação durante aproximadamente 24 horas (ainda em meio osmótico). Após 24 h, os embriões são removidos do meio osmótico e colocados de volta no meio de indução onde ficam durante aproximadamente um mês antes da regeneração. Aproximadamente um mês depois os explantes de embrião com calo embriogênico em desenvolvimento são transferidos para o meio de regeneração (MS + 1 mg/litro de NAA, 5 mg/litro de GA), contendo adicionalmente o agente de seleção apropriado (10 mg/L de basta no caso de pCIB3064 e 2 mg/L de metotrexato no caso de pSOG35). Após aproximadamente um mês, os brotos desenvolvidos são transferidos para recipientes esterilizados maiores conhecidos como "GA7s" que contêm MS em meia concentração, 2% de sacarose e a mesma concentração do agente de seleção.

Foi também descrita a transformação de monocotiledôneas utilizando *Agrobacterium*. Ver, a WO 94/00977 e a Patente U.S. Nº 5.591.616, das quais ambas são incorporaas aqui como referência. Ver também, Negrotto e outros, Plant Cell Reports 19: 798-803 (2000), incorporado aqui como referência. Para este exemplo, o arroz (*Oryza sativa*) é utilizado para a

produção de plantas transgênicas. Vários cultivares de arroz podem ser utilizados (Hiei e outros, 1994, Plant Journal 6:271-282; Dong e outros, 1996, Molecular Breeding 2:267-276; Hiei e outros, 1997, Plant Molecular Biology, 35:205-218). Ainda, os vários constituintes dos meios descritos abaixo podem ser variados em relação à quantidade ou substituídos. As respostas embriogênicas são iniciadas e/ou as culturas são estabelecidas partindo de embriões maduros através do cultivo em meio MS-CIM (sais basais de MS, 4,3 g/litro; vitaminas B5 (200 x), 5 mL/litro; Sacarose, 30 g/litro; prolina, 500 mg/litro; glutamina, 500 mg/litro; caseína hidrolisada, 300 mg/litro; 2,4-D (1 mg/mL), 2 mL/litro; ajustar o pH em 5,8 com KOH a 1 N; Phytagel, 3 g/litro). Os embriões maduros nos estágios iniciais de resposta de cultura ou as linhagens de cultura estabelecidas são inoculadas e co-cultivadas com a cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium*) contendo o constructo de vetor desejada. O *Agrobacterium* é cultivado partindo de estoques de glicerol em meio YPC sólido (100 mg/L de espectinomicina e qualquer outro antibiótico apropriado) durante ~2 dias a 28°C. O *Agrobacterium* é ressuspenso em meio MS-CIM líquido. A cultura de *Agrobacterium* é diluída até uma DO600 de 0,2-0,3 e a acetossiringona é adicionada em uma concentração final de 200 µM. A acetossiringona é adicionada antes da mistura da solução com as culturas de arroz para induzir o *Agrobacterium* a transferir o DNA para as células vegetais. Para a inoculação, as culturas de plantas são imersas na suspensão bacteriana. A suspensão bacteriana líquida é removida e as culturas inoculadas são colocadas em meio de co-cultivo e incubadas a 22°C durante dois dias. As culturas são então transferidas para o meio MS-CIM com Ticarcilina (400 mg/litro) para inibir o crescimento de *Agrobacterium*. Para os constructos que utilizam o gene marcador que pode ser selecionado PMI (Reed e outros, In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 37:127-132), as culturas são transferidas para o meio de seleção contendo Manose como uma fonte de carboidrato (MS com 2% de Manose, 300 mg/litro de Ticarcilina) após 7 dias e crescidas durante 3-4 semanas na escuridão. As colônias resistentes são então transferidas para o meio de indução da regeneração (MS sem 2,4-D, 0,5 mg/litro de IAA, 1 mg/litro de zeatina, 200

mg/litro de timentina 2% de Manose e 3% de Sorbitol) e crescidas na escuridão durante 14 dias. As colônias em proliferação são então transferidas para um outro ciclo de meio de indução da regeneração e transferidas para a câmara de crescimento na luz. Os brotos regenerados são transferidos para recipientes GA7 com meio GA7-1 (MS sem hormônios e 2% de Sorbitol) durante 2 semanas e então transferidos para a estufa quando estão grandes o suficiente e possuem raízes adedquadas. As plantas são transplantadas para o solo na estufa (geração T0) crescidas até a maturidade e a semente T1 é colhida.

3. Transformação de Pastídeos

As sementes de *Nicotiana tabacum* c.v. 'Xanthi nc' são germinadas sete por placa em um arranjo circular de 2,54 cm (1") em meio agar T e bombardeadas 12-14 dias após a semeadura com partículas de tungstênio de 1 µm (M10, Biorad, Hercules, CA) revestidas com o DNA dos plasmídeos pPH143 e pPH145 essencialmente como descrito (Svab, Z. e Maliga, P. (1993) PNAS 90, 913–917). As mudas bombardeadas são incubadas em meio T durante dois dias após os quais as folhas são cortadas e colocadas com a porção abaxial voltada para cima em luz forte (350-500 µmoles de fótons/m2/s) em placas de meio RMOP (Svab, Z., Hajdukiewicz, P. e Maliga, P. (1990) PNAS 87, 8526–8530) contendo 500 µg/mL de dicloridrato de espectinomicina (Sigma, St. Louis, MO). Os brotos resistentes que aparecem debaixo das folhas branqueadas três até oito semanas após o bombardeio são subclonados no mesmo meio seletivo, é permitido que formem calo e os brotos secundários são isolados e subclonados. A segregação completa de cópias do genoma do plastídeo transformado (homoplasmicidade) em subclones independentes é avaliada através de técnicas padronizadas de Southern blotting (Sambrook e outros, (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor). O DNA celular total digerido com BamHI/EcoRI (Mettler, I. J. (1987) Plant Mol Biol Reporter 5, 346–349) é separado em géis de agarose Tris-borato a 1% (TBE), transferido para membranas de náilon (Amersham) e submetido ao tratamento com sonda com sequências de DNA iniciadas aleatoriamente marcadas com 32P

correspondendo a um fragmento de DNA de BamHI/HindIII de 0,7 kb do pC8 contendo uma parte da sequência de direcionamento ao plastídeo rps7/12. Os brotos homoplasmáticos são enraizados assepticamente em meio MS/IBA contendo espectinomicina (McBride, K. E. e outros (1994) PNAS 91, 7301-7305) e transferidos para a estufa.

V. Cruzamento e Produção de Sementes

A. Cruzamento

As plantas obtidas através da transformação com uma sequência de ácido nucléico da presente invenção podem ser de uma ampla variedade de espécies de plantas, incluindo aquelas de monocotiledôneas e de dicotiledôneas; entretanto, as plantas utilizadas no método da invenção são especificamente selecionadas da lista de plantas de cultivo alvo agronomicamente importantes apresentadas *supra*. A expressão de um gene da presente invenção em combinação com outras características importantes para a produção e para a qualidade pode ser incorporada nas linhagens de plantas através do cruzamento. As abordagens e as técnicas de cruzamento são conhecidas na técnica . Ver, por exemplo, Welsh J. R., Fundamentals of Plant Genetics and Breeding, John Wiley & Sons, NY (1981); Crop Breeding, Wood D. R. (Ed.) American Society of Agronomy Madison, Wisconsin (1983); Mayo O., The Theory of Plant Breeding, Segunda Edição, Clarendon Press, Oxford (1987); Singh, D.P., Breeding for Resistence to Diseases and Insect Pests, Springer-Verlag, NY (1986); e Wricke e Weber, Quantitative Genetics and Selection Plant Breeding, Walter de Gruyter e Co., Berlin (1986).

As propriedades genéticas engenheiradas nas sementes e nas plantas transgênicas descritas anteriormente são passadas a diante através de reprodução sexual ou de crescimento vegetativo e podem assim ser mantidas e propagadas nas plantas de progênie. Geralmente, as ditas manutenção e propagação fazem uso de métodos agrícolas conhecidos desenvolvidos para realizar finalidades específicas tal como aradura, semeadura ou colheita. Processos especializados tal como hidroponia ou tecnologias em estufa podem também ser aplicados. Uma vez que a planta de cultivo em

crescimento é vulnerável ao ataque e aos danos causados por insetos ou infecções assim como à competição por ervas daninhas, são tomadas medidas para controlar as ervas daninas, as doenças de plantas, os insetos, os nematóides e outras condições adversas para aumentar o rendimento. Estas incluem medidas mecânicas tal como uma aradura do solo ou a remoção de ervas daninhas e plantas infectadas, assim como a aplicação de produtos agroquímicos tais como herbicidas, fungicidas, gametocidas, nematocidas, agentes reguladores do crescimento, agentes de maturação e inseticidas.

O uso das propriedades genéticas vantajosas das plantas e sementes transgênicas de acordo com a invenção pode ser adicionalmente realizado no cruzamento de plantas, que visa o desenvolvimento de plantas com propriedades melhoradas tal como tolerância a pragas, herbicidas ou estresse, maior valor nutricional, maior rendimento ou estrutura melhorada causando menor perda de alojamento ou por fragmentação. As várias etapas de cruzamento são caracterizadas por intervenção humana bem definida tal como a seleção das linhagens que serão cruzadas, o direcionamento da polinização das linhagens parentais ou a seleção de plantas de progênie apropriadas. Dependendo das propriedades desejadas, são tomadas medidas de cruzamento diferentes. As técnicas relevantes são bem-conhecidas na técnica e incluem, mas não estão limitadas à hibridização, ao intracruzamento, ao cruzamento por retrocruzamento, ao cruzamento multilinhagem, à mistura de variedades, à hibridização interespecífica, às técnicas aneuplóides etc. As técnicas de hibridização incluem ainda a esterilização de plantas para produzir plantas estéreis do sexo masculino ou do sexo feminino através de meios mecânicos, químicos ou bioquímicos. A polinização cruzada de uma planta estéril do sexo masculino com o pólen de uma linhagem diferente garante que o genoma da planta estéril do sexo masculino exceto a planta fértil do sexo feminino obterá uniformemente propriedades de ambas as linhagens parentais. Assim, as sementes e as plantas transgênicas de acordo com a invenção podem ser utilizadas para o cruzamento de linhagens de plantas melhoradas, que, por exemplo, aumenta a eficiência de métodos convencionais tal como o tratamento com herbicida ou com pestici-

da ou permite que os ditos métodos sejam dispensados devido as suas propriedades genéticas modificadas. Alternativamente, podem ser obtidas novas plantas de cultivo com maior tolerância ao estresse, que, devido ao seu "equipamento" genético otimizado, geram um produto coletado de melhor qualidade que os produtos que não eram capazes de tolerar condições do desenvolvimento adversas comparáveis.

B. Produção de Sementes

Na produção de sementes, a qualidade e a uniformidade de germinação das sementes são as características essenciais do produto. Uma vez que é difícil manter uma planta de cultivo livre de outras sementes de plantas de cultivo e ervas daninhas, para controlar doenças transmitidas pelas sementes e para produzir semente com boa germinação, foram desenvolvidas práticas de produção de sementes bastante extensas e bem definidas pelos produtores de sementes que são experientes na técnica de cultivo, condicionamento e comercialização de sementes puras. Assim, é uma prática comum para o cultivador comprar sementes certificadas que satisfazem padrões de qualidade específicos ao invés de utilizar sementes colhidas de sua própria plantação. O material de propagação que será utilizado como sementes é habitualmente tratado com um revestimento protetor que compreende herbicidas, inseticidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, moluscicidas ou misturas dos mesmos. Os revestimentos protetores utilizados habitualmente compreendem compostos tais como captan, carboxin, tiram (TMTD®), metalaxil (Apron®) e pirimifos-metil (Actellic®). Se desejado, estes compostos são formulados juntos com carreadores, tensoativos ou adjuvantes promotores de aplicação adicionais empregados de forma costumeira na técnica da formulação para fornecer proteção contra os danos causados por pragas bacterianas, fúngicas ou animais. Os revestimentos protetores podem ser aplicados através da impregnação do material de propagação com uma formulação líquida ou através do revestimento com uma formulação úmida ou seca combinada. São também possíveis outros métodos de aplicação tal como o tratamento direcionado aos brotos ou ao fruto.

VI. Alteração da Expressão das Moléculas de Ácidos Nucléicos

A alteração na expressão das moléculas de ácidos nucléicos da presente invenção é conseguida em uma das maneiras a seguir:

A. Supressão "Senso"

A alteração da expressão de uma sequência de nucleotídeos da presente invenção, especificamente a redução de sua expressão, é obtida através da supressão "senso" (referida, por exemplo, em Jorgensen e outros (1996) Plant Mol. Biol. 31, 957-973). Neste caso, toda ou uma parte de uma sequência de nucleotídeos da presente invenção é compreendida em uma molécula de DNA. A molécula de DNA é ligada de forma operacional especificamente a um promotor funcional em uma célula que compreende o gene alvo, especificamente uma célula vegetal e é introduzida na célula, na qual a sequência de nucleotídeos pode ser expressa. A sequência de nucleotídeos é inserida na molécula de DNA na "orientação senso", significando que o filamento codificador da sequência de nucleotídeos pode ser transcrito. Em uma modalidade específica, a sequência de nucleotídeos pode ser completamente traduzida e toda a informação genética compreendida na sequência de nucleotídeos ou parte da mesma, é traduzida em um polipeptídeo. Em uma outra modalidade específica, a sequência de nucleotídeos pode ser parcialmente traduzida e um peptídeo curto é traduzido. Em uma modalidade específica, isto é conseguido através da inserção de pelo menos um códon de término prematuro na sequência de nucleotídeos, que leva a tradução a uma interrupção. Em uma outra modalidade mais específica, a sequência de nucleotídeos é transcrita, mas nenhum produto da tradução é produzido. Isto é geralmente conseguido através da remoção do códon de início, por exemplo, o "ATG", do polipeptídeo codificado pela sequência de nucleotídeos. Em uma modalidade específica adicional, a molécula de DNA que compreende a sequência de nucleotídeos ou uma parte da mesma, é integrada de forma estável no genoma da célula vegetal. Em uma outra modalidade específica, a molécula de DNA que compreende a sequência de nucleotídeos ou uma parte da mesma, fica compreendida em uma molécula que se replica de forma extracromossômica.

Nas plantas transgênicas que contêm uma das moléculas de DNA descritas imediatamente acima, a expressão da sequência de nucleotídeos que corresponde à sequência de nucleotídeos compreendida na molécula de DNA é especificamente reduzida. Especificamente, a sequência de nucleotídeos na molécula de DNA é pelo menos 70% idêntica à sequência de nucleotídeos cuja expressão é reduzida, mais especificamente é pelo menos 80% idêntica, ainda mais especificamente pelo menos 90% idêntica, ainda mais especificamente pelo menos 95% idêntica, ainda mais especificamente pelo menos 99% idêntica.

B. Supressão "Antissenso"

Em uma outra modalidade específica, a alteração da expressão de uma sequência de nucleotídeos da presente invenção, especificamente a redução de sua expressão é obtida através da supressão "antissenso". Toda ou uma parte de uma sequência de nucleotídeos da presente invenção é compreendida em uma molécula de DNA. A molécula de DNA está ligada de forma operacional especificamente a um promotor funcional em uma célula vegetal e é introduzida em uma célula vegetal, em que a sequência de nucleotídeos pode ser expressa. A sequência de nucleotídeos é inserida na molécula de DNA na "orientação antissenso", significando que o complemento inverso (também chamado algumas vezes de filamento não codificador) da sequência de nucleotídeos pode ser transcrito. Em uma modalidade específica, a molécula de DNA que compreende a sequência de nucleotídeos ou uma parte da mesma, é integrada de forma estável no genoma da célula vegetal. Em uma outra modalidade específica a molécula de DNA que compreende a sequência de nucleotídeos ou uma parte da mesma, fica compreendida em uma molécula que se replica de forma extracromossômica. Várias publicações que descrevem esta abordagem são citadas para ilustração adicional (Green, P. J. e outros, Ann. Rev. Biochem. 55:569-597 (1986); van der Krol, A. R. e outros, Antisense Nuc. Acids & Proteins, pp. 125-141 (1991); Abel, P. P. e outros, PNASroc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6949-6952 (1989); Ecker, J. R. e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USANAS 83:5372-5376 (agosto de 1986)).

Nas plantas transgênicas que contêm uma das moléculas de DNA descritas imediatamente acima, a expressão da sequência de nucleotídeos que corresponde à sequência de nucleotídeos compreendida na molécula de DNA é especificamente reduzida. Especificamente, a sequência de nucleotídeos na molécula de DNA é pelo menos 70% idêntica à sequência de nucleotídeos cuja expressão é reduzida, mais especificamente é pelo menos 80% idêntica, ainda mais especificamente pelo menos 90% idêntica, ainda mais especificamente pelo menos 95% idêntica, ainda mais especificamente pelo menos 99% idêntica.

C. Recombinação Homóloga

Em uma outra modalidade específica, pelo menos uma cópia genômica que corresponde a uma sequência de nucleotídeos da presente invenção é modificada no genoma da planta através de recombinação homóloga como ilustrado adicionalmente em Paszkowski e outros, EMBO Journal 7:4021-26 (1988). Esta técnica utiliza a propriedade das sequências homólogas de reconhecer cada outra e de trocar sequências de nucleotídeos entre cada uma através de um processo conhecido na técnica como recombinação homóloga. A recombinação homóloga pode ocorrer entre a cópia cromossômica de uma sequência de nucleotídeos em uma célula e uma cópia que se aproxima da sequência de nucleotídeos introduzida na célula através de transformação. As modificações específicas são assim introduzidas de forma acurada na cópia cromossômica da sequência de nucleotídeos. Em uma modalidade, os elementos reguladores da sequência de nucleotídeos da presente invenção são modificados. Tais elementos reguladores podem ser facilmente obtidos através da verificação de uma biblioteca genômica utilizando a sequência de nucleotídeos da presente invenção ou uma parte da mesma, como uma sonda. Os elementos reguladores existentes são substituídos por elementos reguladores diferentes, alterando assim a expressão da sequência de nucleotídeos ou são mutados ou deletados, anulando assim a expressão da sequência de nucleotídeos. Em uma outra modalidade, a sequência de nucleotídeos é modificada através da deleção de uma parte da sequência de nucleotídeos ou de toda a sequência de nucleo-

tídeos ou através de mutação. A expressão de um polipeptídeo mutado em uma célula vegetal é também considerada na presente invenção. Foram descritos refinamentos mais recentes desta técnica para interromper os genes endógenos da planta (Kempin e outros, Nature 389:802-803 (1997) e Miao e Lam, Plant J., 7:359-365 (1995).

Em uma outra modalidade específica, uma mutação na cópia cromossômica de uma sequência de nucleotídeos é introduzida através da transformação de uma célula com um oligonucleotídeo quimérico composto de um filamento contíguo de resíduos de RNA e de DNA em uma conformação em dúpléx com caps em grampo duplos nas extremidades. Uma característica adicional do oligonucleotídeo é, por exemplo, a presença de 2'-O-metilação nos resíduos de RNA. A sequência de RNA/DNA é planejada para se alinhar com uma sequência de uma cópia cromossômica de uma sequência de nucleotídeos da presente invenção e para conter a alteração de nucleotídeo desejada. Por exemplo, esta técnica é adicionalmente ilustrada na Patente U.S. Nº 5.501.967 e Zhu e outros (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8768-8773.

D. Ribozimas

Em uma modalidade adicional, o RNA que codifica um polipeptídeo da presente invenção é clivado por um RNA catalítico ou ribozima, específica para tal RNA. A ribozima é expressa nas plantas transgênicas e resulta em quantidades reduzidas de RNA que codifica o polipeptídeo da presente invenção nas células vegetais, levando assim a quantidades reduzidas do polipeptídeo acumulado nas células. Este método é adicionalmente ilustrado na Patente U.S. Nº 4.987.071.

E. Mutantes Negativos Dominantes

Em uma outra modalidade específica, a atividade do polipeptídeo codificado pelas sequências de nucleotídeos desta invenção é alterada. Isto é conseguido através da expressão de mutantes negativos dominantes das proteínas nas plantas transgênicas, levando à perda de atividade da proteína endógena.

F. Aptâmeros

Em uma modalidade adicional, a atividade do polipeptídeo da presente invenção é inibida pela expressão nas plantas transgênicas de ligantes de ácidos nucléicos, os assim chamados aptâmeros, que se ligam especificamente à proteína. Os aptâmeros são preferencialmente obtidos através do método SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment). No método SELEX, uma mistura de candidatos de ácidos nucléicos de filamento simples que possuem regiões de sequência aleatória é colocada em contato com a proteína e tais ácidos nucléicos que possuem uma maior afinidade pelo alvo são separados do restante da mistura de candidatos. Os ácidos nucléicos separados são amplificados para fornecer uma mistura enriquecida com ligantes. Após várias repetições, é obtido um ácido nucléico com afinidade ótima ao polipeptídeo e é utilizado para a expressão em plantas transgênicas. Este método é adicionalmente ilustrado na Patente U.S. Nº 5.270.163.

G. Proteínas dedo de zinco

Uma proteína dedo de zinco que se liga com uma sequência de nucleotídeos da presente invenção ou com sua região reguladora é também utilizada para alterar a expressão da sequência de nucleotídeos. Especificamente, a transcrição da sequência de nucleotídeos é reduzida ou aumentada. As proteínas dedo de zinco são, por exemplo, descritas em Beerli e outros (1998) PNAS 95:14628-14633 ou na WO 95/19431, na WO 98/54311 ou na WO 96/06166, todos incorporados aqui como referência em sua totalidade.

H. dsRNA

A alteração da expressão de uma sequência de nucleotídeos da presente invenção é também obtida através da interferência com dsRNA como descrito, por exemplo, na WO 99/32619, na WO 99/53050 ou na WO 99/61631, todas incorporadas aqui como referência em sua totalidade. Em uma outra modalidade específica, a alteração da expressão de uma sequência de nucleotídeos da presente invenção, especificamente a redução de sua expressão, é obtida através da interferência com RNA de filamento duplo (dsRNA). Toda ou, especificamente uma parte de uma sequência de nu-

cleotídeos da presente invenção é compreendida em uma molécula de DNA. O tamanho da molécula de DNA é especificamente de 100 até 1000 nucleotídeos ou mais; o tamanho ótimo será determinado empiricamente. Duas cópias da molécula de DNA idêntica são ligadas, separadas por uma molécula de DNA espaçadora, de forma que a primeira e a segunda cópias fiquem em orientações opostas. Na modalidade específica, a primeira cópia da molécula de DNA está no complemento inverso (também conhecido como filamento não codificador) e a segunda cópia está no filamento codificador; na modalidade mais específica, a primeira cópia é o filamento codificador e a segunda cópia é o complemento inverso. O tamanho da molécula de DNA espaçadora é especificamente de 200 até 10.000 nucleotídeos, mais especificamente de 400 até 5000 nucleotídeos e mais especificamente de 600 até 1500 nucleotídeos de comprimento. O espaçador é especificamente um pedaço aleatório de DNA, mais especificamente um pedaço aleatório de DNA sem homologia com o organismo alvo em relação à interferência com dsRNA e mais especificamente um íntron funcional que é eficientemente processado pelo organismo alvo. As duas cópias da molécula de DNA separadas pelo espaçador estão ligadas de forma operacional a um promotor funcional em uma célula vegetal e são introduzidas em uma célula vegetal, na qual a sequência de nucleotídeos pode ser expressa. Em uma modalidade específica, a molécula de DNA que compreende a sequência de nucleotídeos ou uma parte da mesma, está integrada de forma estável no genoma da célula vegetal. Em uma outra modalidade específica, a molécula de DNA que compreende a sequência de nucleotídeos ou uma parte da mesma, fica compreendida em uma molécula que se replica de forma extracromossômica. Várias publicações que descrevem esta abordagem são citadas para ilustração adicional (Waterhouse e outros (1998) PNAS 95:13959-13964; Chuang e Meyerowitz (2000) PNAS 97:4985-4990; Smith e outros (2000) Nature 407:319-320). A alteração da expressão de uma sequência de nucleotídeos através da interferência com dsRNA também é descrita, por exemplo, na WO 99/32619, na WO 99/53050 ou na WO 99/61631, todas incorporadas aqui como referência em sua totalidade.

Nas plantas transgênicas que contêm uma das moléculas de DNA descritas imediatamente acima, a expressão da sequência de nucleotídeos que corresponde à sequência de nucleotídeos compreendida na molécula de DNA é especificamente reduzida. Especificamente, a sequência de nucleotídeos na molécula de DNA é pelo menos 70% idêntica à sequência de nucleotídeos cuja expressão é reduzida, mais especificamente é pelo menos 80% idêntica, ainda mais especificamente pelo menos 90% idêntica, ainda mais especificamente pelo menos 95% idêntica, ainda mais especificamente pelo menos 99% idêntica.

I. Inserção de uma molécula de DNA (Mutagênese de inserção)

Em uma outra modalidade específica, uma molécula de DNA é inserida em uma cópia cromossômica de uma sequência de nucleotídeos da presente invenção ou dentro de uma região reguladora da mesma. Especificamente, tal molécula de DNA compreende um elemento de transposição capaz de sofrer transposição em uma célula vegetal, tal como, por exemplo, Ac/Ds, Em/Spm, agente de mutação. Alternativamente, a molécula de DNA compreende uma borda de T-DNA de um T-DNA de *Agrobacterium*. A molécula de DNA também pode compreender um sítio de reconhecimento de recombinase ou de integrase que pode ser utilizado para remover parte da molécula de DNA do cromossomo da célula vegetal. Os métodos de mutagênese de inserção utilizando T-DNA, transposons, oligonucleotídeos ou outros métodos conhecidos pelos versados na técnica também podem ser incluídos. Os métodos de fusão do T-DNA e do transposon para a mutagênese de inserção são descritos em Winkler e outros (1989) Methods Mol. Biol. 82:129-136 e Martienssen (1998) PNAS 95:2021-2026, incorporados aqui como referência em suas totalidades.

J. Mutagênese de deleção

Ainda em uma outra modalidade, uma mutação de uma molécula de ácido nucléico da presente invenção é criada na cópia genômica de uma sequência na célula ou na planta através da deleção de uma parte da sequência de nucleotídeos ou da sequência reguladora. Os métodos de mutagênese de deleção são conhecidos pelos peritos na técnica . Ver, por e-

xemplo, Miao e outros, (1995) Plant J. 7:359.

Ainda em uma outra modalidade, esta deleção é criada aleatoriamente em uma grande população de plantas através de mutagênese química ou de irradiação e uma planta com uma deleção em um gene da presente invenção é isolada através da genética passada adiante ou inversa. É sabido que a irradiação com nêutrons rápidos ou raios gama causa mutações de deleção nas plantas (Silverstone e outros, (1998) Plant Cell, 10:155-169; Bruggemann e outros, (1996) Plant J., 10:755-760; Redei e Koncz em Methods in *Arabidopsis* Research, World Scientific Press (1992), pp. 16-82). As mutações de deleção em um gene da presente invenção podem ser recuperadas em uma estratégia de genética inversa utilizando a PCR com conjuntos agrupados de DNAs genômicos como foi mostrado em *C. elegans* (Liu e outros, (1999), Genome Research, 9:859-867.). Uma estratégia de genética passada adiante envolveria a mutagênese de uma linhagem que exibe PTGS seguida pela verificação da progênie M2 em relação à ausência de PTGS. Dentre estes mutantes seria esperado haver algum que interrompesse um gene da presente invenção. Isto poderia ser avaliado através de Southern blot ou PCR para um gene da presente invenção com o DNA genômico proveniente destes mutantes.

K. Superexpressão em uma célula vegetal

Ainda em uma outra modalidade específica, uma sequência de nucleotídeos da presente invenção que codifica um polipeptídeo é superexpressa. Os exemplos de moléculas de ácidos nucléicos e de cassetes de expressão para a superexpressão de uma molécula de ácido nucléico da presente invenção são descritos anteriormente. Os métodos conhecidos pelos versados na técnica de superexpressão de moléculas de ácidos nucléicos também são abrangidos pela presente invenção.

Em uma modalidade específica, a expressão da sequência de nucleotídeos da presente invenção é alterada em cada célula de uma planta. Isto é obtido, por exemplo, através de recombinação homóloga ou de inserção no cromossomo. Isto é também obtido, por exemplo, através da expressão de um RNA senso ou antissenso, uma proteína dedo de zinco ou uma

ribozima sob o controle de um promotor capaz de expressar o RNA senso ou antissenso, a proteína dedo de zinco ou a ribozima em cada célula de uma planta. A expressão constitutiva, a expressão que pode ser induzida, específica ao tecido ou regulada pelo desenvolvimento também está dentro do âmbito da presente invenção e resulta em uma alteração constitutiva, que pode ser induzida, específica ao tecido ou regulada pelo desenvolvimento da expressão de uma sequência de nucleotídeos da presente invenção na célula vegetal. os constructos para a expressão do RNA senso ou antissenso, da proteína dedo de zinco ou da ribozima ou para a superexpressão de uma sequência de nucleotídeos da presente invenção, são preparadas e transformadas em uma célula vegetal de acordo com os ensinamentos da presente invenção, por exemplo, como descrito *infra*.

VII. Polipeptídeos

A presente invenção refere-se ainda a polipeptídeos isolados que compreendem a sequência de aminoácidos das SEQ ID Nºs: 2, 4, 6, 8, 10. Em particular, polipeptídeos isolados compreendendo a sequência de aminoácidos das SEQ ID Nºs: 2, 4, 6, 8, 10 e variações que possuem modificações de aminoácidos conservativas. Um versado na técnica reconhecerá que substituições, deleções ou adições individuais em uma sequência de ácido nucléico, de peptídeo, de polipeptídeo ou de proteína que alteram, adicionam ou deletam um único aminoácido ou uma pequena porcentagem de aminoácidos na sequência codificada constituem uma "modificação conservativa" em que a modificação resulta em uma substituição de um aminoácido por um aminoácido quimicamente similar. As variações modificadas conservativas fornecem atividade biológica similar à do polipeptídeo não modificado. As tabelas de substituições conservativas que listam aminoácidos funcionalmente similares são conhecidas na técnica . Ver Crighton (1984) Proteins, W.H. Freeman and Company.

Em uma modalidade específica, um polipeptídeo que possui similaridade substancial a uma sequência de polipeptídeo da SEQ ID Nº: 2, incluindo as sequências de polipeptídeos da SEQ ID Nº: 4, da SEQ ID Nº: 6, da SEQ ID Nº: 8 ou da SEQ ID Nº: 10 ou um éxon ou um domínio da mes-

ma, é uma variação alélica da sequência de polipeptídeo listada na SEQ ID Nº: 2. Em uma outra modalidade específica, um polipeptídeo que possui similaridade substancial a uma sequência de polipeptídeo listada na SEQ ID Nº: 2 ou um éxon ou um domínio da mesma, é uma variação que ocorre naturalmente da sequência de polipeptídeo listada na SEQ ID Nº: 2. Em uma outra modalidade específica, um polipeptídeo que possui similaridade substancial a uma sequência de polipeptídeo listada na SEQ ID Nº: 2 ou um éxon ou um domínio da mesma, é uma variação polimórfica da sequência de polipeptídeo listada na SEQ ID Nº: 2.

Em uma modalidade específica alternativa, a sequência que possui similaridade substancial contém uma deleção ou uma inserção de pelo menos um aminoácido. Em uma modalidade mais específica, a deleção ou a inserção é menor que aproximadamente dez aminoácidos. Em uma modalidade mais específica, a deleção ou a inserção é menor que aproximadamente três aminoácidos.

Em uma modalidade específica, a sequência que possui similaridade substancial codifica uma substituição em pelo menos um aminoácido.

Em uma outra modalidade específica, o polipeptídeo que possui similaridade substancial é uma variação alélica de uma sequência de polipeptídeo listada na SEQ ID Nº: 2 ou um fragmento, um domínio, uma repetição ou quimeras da mesma. Em uma outra modalidade específica, o ácido nucléico isolado inclui um grande número de regiões da sequência de polipeptídeo codificada por uma sequência de nucleotídeos idêntica a ou que possui similaridade substancial a uma sequência de nucleotídeos listada na SEQ ID Nº: 1 ou um fragmento ou um domínio da mesma ou uma sequência complementar à mesma.

Em uma outra modalidade específica, o polipeptídeo é uma sequência de polipeptídeo listada na SEQ ID Nº: 2. Em uma outra modalidade específica, o polipeptídeo é um fragmento ou um domínio funcional. Ainda em uma outra modalidade específica, o polipeptídeo é uma quimera, em que a quimera pode incluir domínios de proteínas funcionais, incluindo domínios, repetições, sítios de modificação pós-tradução ou outras características. Em

uma modalidade mais específica, o polipeptídeo é um polipeptídeo de planta. Em uma modalidade mais específica, a planta é uma dicotiledônea. Em uma modalidade mais específica, a planta é uma gimnosperma. Em uma modalidade mais específica, a planta é uma monocotiledônea. Em uma modalidade mais específica, a monocotiledônea é um cereal. Em uma modalidade mais específica, o cereal pode ser, por exemplo, milho, trigo, cevada, aveia, centeio, painço, sorgo, triticale, secale, *Trigo einkorn*, espelta, *Trigo emmer*, teff, sorgo, linho, grama, *Tripsacum* e teosinte. Em uma outra modalidade específica, o cereal é arroz.

Em uma modalidade específica, o polipeptídeo é expresso em uma localização ou em um tecido específico de uma planta. Em uma modalidade mais específica, a localização ou o tecido é, por exemplo, mas não está limitado a epiderme, tecido vascular, meristema, câmbio, córtex ou seiva. Em uma modalidade mais específica, a localização ou o tecido é folha ou bainha, raiz, flor e óvulo em desenvolvimento ou semente. Em uma modalidade mais específica, a localização ou o tecido pode ser, por exemplo, epiderme, raiz, tecido vascular, meristema, câmbio, córtex, seiva, folha e flor. Em uma modalidade mais específica, a localização ou o tecido é uma semente.

Em uma modalidade específica, a sequência de polipeptídeo codificada por uma sequência de nucleotídeos que possui similaridade substancial a uma sequência de nucleotídeos listada na SEQ ID Nº: 1 incluindo as sequências de nucleotídeos da SEQ ID Nº: 3, SEQ ID Nº:5, SEQ ID Nº:7 ou SEQ ID Nº:9 ou um fragmento ou um domínio da mesma ou uma sequência complementar à mesma, é uma variação mutante da sequência de nucleotídeos listada na SEQ ID Nº: 1 e inclui uma substituição, uma deleção ou uma inserção de pelo menos um nucleotídeo. Em uma modalidade mais específica, a deleção ou a inserção é menor que aproximadamente trinta nucleotídeos. Em uma modalidade mais específica, a deleção ou a inserção é menor que aproximadamente cinco nucleotídeos.

Em uma modalidade específica, a sequência de polipeptídeo codificada por uma sequência de nucleotídeos que possui similaridade subs-

tancial a uma sequência de nucleotídeos listada nas SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 ou um fragmento ou um domínio da mesma ou uma sequência complementar à mesma, inclui uma substituição de pelo menos um códon. Em uma modalidade mais específica, a substituição é conservativa.

Em uma modalidade específica, as sequências de polipeptídeos que possuem similaridade substancial à sequência de polipeptídeo listada na SEQ ID Nº: 2 ou um fragmento, um domínio, uma repetição ou quimeras da mesma inclui uma substituição, uma deleção ou uma inserção de pelo menos um aminoácido.

Os polipeptídeos da invenção, os fragmentos dos mesmos ou as variações dos mesmos podem compreender qualquer número de resíduos de aminoácidos contíguos de um polipeptídeo da invenção, em que o número de resíduos é selecionado do grupo de números inteiros que consiste em 10 até o número de resíduos em um polipeptídeo de comprimento completo da invenção. Especificamente, a parte ou o fragmento do polipeptídeo é uma proteína funcional. A presente invenção inclui polipeptídeos ativos que possuem atividade específica de pelo menos 20%, 30% ou 40% e especificamente pelo menos 50%, 60% ou 70% e mais especificamente pelo menos 80%, 90% ou 95% daquela do polipeptídeo endógeno nativo (não sintético). Ainda, a especificidade do substrato (kcat/Km) é opcionalmente substancialmente similar à do polipeptídeo endógeno nativo (não sintético). Tipicamente a Km será pelo menos 30%, 40% ou 50% do polipeptídeo endógeno nativo; e mais especificamente pelo menos 60%, 70%, 80% ou 90%. Os métodos de análise e de quantificação das medidas de atividade e de especificidade ao substrato são bem-conhecidos pelos peritos na técnica .

Os polipeptídeos isolados da presente invenção ativarão a produção de um anticorpo especificamente reativo a um polipeptídeo da presente invenção quando apresentados na forma de um agente imunogênico. Portanto, os polipeptídeos da presente invenção podem ser empregados como agentes imunogênicos para o constructo de anticorpos imunorreativos a uma proteína da presente invenção para tais finalidades, mas não estão limitados a ensaios imunológicos ou técnicas de purificação de proteínas.

Os ensaios imunológicos para a determinação são bem-conhecidos pelos versados na técnica tais como, mas não limitados a ELISAs ou ensaios imunológicos competitivos.

As modalidades da presente invenção se referem ainda a polipeptídeos quiméricos codificados pelas moléculas de ácidos nucléicos isoladas da presente descrição incluindo um polipeptídeo quimérico que contém uma sequência de polipeptídeo codificada por um ácido nucléico isolado contendo sequência de nucleotídeos que inclui:

(a) uma sequência de nucleotídeos listada nas SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 ou um éxon ou um domínio da mesma;

(b) uma sequência de nucleotídeos que possui similaridade substancial a (a);

(c) uma sequência de nucleotídeos capaz de se hibridizar com (a);

(d) uma sequência de nucleotídeos complementar a (a), (b) ou (c); e

(e) uma sequência de nucleotídeos que é o complemento inverso de (a), (b) ou (c); ou

(f) um fragmento funcional da mesma.

Um polipeptídeo que contém uma sequência de polipeptídeo codificada por um ácido nucléico isolado que contém uma sequência de nucleotídeos, seu complemento ou seu complemento inverso, que codifica um polipeptídeo incluindo uma sequência de polipeptídeo que inclui:

(a) uma sequência de polipeptídeo listada na SEQ ID Nº: 2 ou um domínio, uma repetição ou quimeras da mesma;

(b) uma sequência de polipeptídeo que possui similaridade substancial a (a), incluindo as sequências de polipeptídeos listadas nas SEQ ID Nº: 4, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 8 e SEQ ID Nº: 10;

(c) uma sequência de polipeptídeo codificada por uma sequência de nucleotídeos idêntica a ou que possui similaridade substancial a uma sequência de nucleotídeos listada nas SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 ou um éxon ou um domínio da mesma ou uma sequência complementar à mesma;

(d) uma sequência de polipeptídeo codificada por uma sequência de nucleotídeos capaz de se hibridizar sob condições de estringência média com uma sequência de nucleotídeos listada nas SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 ou com uma sequência complementar à mesma; e um fragmento funcional de (a), (b), (c) ou (d); ou

(e) um fragmento funcional da mesma.

As moléculas de ácidos nucléicos isoladas da presente invenção são úteis para a expressão de um polipeptídeo da presente invenção em uma célula engenheirada de forma recombinante tal como uma célula de bactéria, levedura, inseto, mamífero ou vegetal. As células produzem o polipeptídeo em uma condição não natural (por exemplo, em quantidade, composição, localização e/ou tempo) porque foram alteradas geneticamente para isso. Os versados na técnica estão bem-informados dos vários sistemas de expressão disponíveis para a expressão de ácidos nucléicos que codificam uma proteína da presente invenção e não serão descritos em detalhes a seguir.

Sucintamente, a expressão dos ácidos nucléicos isolados que codificam um polipeptídeo da invenção será tipicamente conseguida, por exemplo, através da ligação de forma operacional do ácido nucléico ou do cDNA a um promotor (constitutivo ou que pode ser regulado) seguida pela incorporação em um vetor de expressão. Os vetores são adequados para a replicação e/ou para a integração em procariotos ou em eucariotos. Os vetores de expressão comumente utilizados compreendem terminadores da transcrição e da tradução, sequências de iniciação e promotores para a regulação da expressão da molécula de ácido nucléico que codifica o polipeptídeo. Para a obtenção de altos níveis de expressão da molécula de ácido nucléico clonada, é desejável utilizar vetores de expressão que compreendem um promotor forte para direcionar a transcrição, um sítio de ligação ao ribossomo para o início da tradução e um terminador da transcrição/tradução. Um versado na técnica reconhecerá que podem ser feitas modificações no polipeptídeo da presente invenção sem diminuir sua atividade biológica. Algumas modificações podem ser feitas para facilitar a clo-

nagem, a expressão ou a incorporação do polipeptídeo da invenção em uma proteína de fusão. Tais modificações são bem-conhecidas na técnica e incluem, mas não estão limitadas a uma metionina adicionada no terminal amino para fornecer um sítio de iniciação ou aminoácidos adicionais (por exemplo, polihistidina) colocados em qualquer um dos terminais para criar sequências de purificação localizadas de forma conveniente. Os sítios de restrição ou os códons de terminação também podem ser introduzidos no vetor.

Em uma modalidade específica, o vetor de expressão inclui um ou mais elementos tal como, por exemplo, mas não limitado a uma sequência intensificadora do promotor, uma sequência marcadora para seleção, uma origem de replicação, uma sequência que codifica uma marcação de epítopo ou uma sequência que codifica uma marcação para purificação por afinidade. Em uma modalidade mais específica, a sequência intensificadora do promotor pode ser, por exemplo, o promotor 35S do CaMV, o promotor 19S do CaMV, o promotor PR-1a do tabaco, o promotor da ubiquitina e o promotor da faseolina. Em uma outra modalidade, o promotor pode ser operacional em plantas e mais especificamente, um promotor constitutivo ou que pode ser induzido. Em uma outra modalidade específica, a sequência marcadora para seleção codifica um gene de resistência a antibiótico. Em uma outra modalidade específica, a sequência de marcação de epítopo codifica V5, o peptídeo Phe-His-His-Thr-Thr, hemaglutinina ou glutationa-S-transferase. Em uma outra modalidade específica, a sequência de marcação para purificação por afinidade codifica uma sequência de poliaminoácidos ou um polipeptídeo. Em uma modalidade mais específica, a sequência de poliaminoácidos é polihistidina. Em uma modalidade mais específica, o polipeptídeo é o domínio de ligação com a quitina ou glutationa-S-transferase. Em uma modalidade mais específica, a sequência de marcação para purificação por afinidade compreende uma sequência que codifica inteína.

As células procarióticas podem ser utilizadas como as células hospedeiras, por exemplo, mas não limitadas a *Escherichia coli* e outras cepas microbiandas conhecidas pelos peritos na técnica . Os métodos para a

expressão de proteínas em células procarióticas são bem-conhecidos pelos versados na técnica e podem ser encontrados em muitos manuais de laboratório tal como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, por J. Sambrook e outros (1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Uma variedade de promotores, sítios de ligação ao ribossomo e operadores para controlar a expressão está disponível aos peritos na técnica , assim como estão os marcadores que podem ser selecionados tais como os genes de resistência a antibióticos. O tipo de vetor escolhido é para permitir o crescimento e a expressão ótimos no tipo celular selecionado.

Uma variedade de sistemas de expressão eucarióticos está disponível tais como, mas não limitados a levedura, linhagens de células de insetos, células vegetais e células de mamíferos. A expressão e a síntese de proteína heterólogas em levedura são bem-conhecidas (ver Sherman e outros, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982). As cepas de levedura comumente utilizadas para a produção de proteínas eucarióticas são *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* e os vetores, as cepas e os protocolos para expressão estão disponíveis em fornecedores comerciais (por exemplo, Invitrogen).

Os sistemas de células de mamíferos podem ser transfectados com vetores de expressão para a produção de proteínas. Muitas linhagens de células hospedeiras adequadas estão disponíveis aos peritos na técnica , tais como, mas não limitadas às linhagens de células HEK293, BHK21 e CHO. Os vetores de expressão para estas células podem incluir sequências de controle da expressão tal como uma origem de replicação, um promotor (por exemplo, o promotor do CMV, um promotor tk do HSV ou o promotor da fosfoglicerato quinase (pgk)), um intensificador e sítios de processamento de proteínas tais como sítios de ligação ao ribossomo, sítios de processamento de RNA, sítios de poliadenilação e sequências terminadora da transcrição. Outras linhagens de células animais para a produção de proteínas estão disponíveis comercialmente ou em depósitos tal como a American Type Culture Collection.

Os vetores de expressão para a expressão de proteínas em cé-

lulas de inseto são geralmente derivados do baculovírus SF9 ou de outros vírus conhecidos na técnica . Um número de linhagens de células de inseto adequadas está disponível incluindo, mas não limitadas a linhagens de células de larva de mosquito, de bicho-da-seda, de lagarta-militar, de traça e de *Drosophila*.

Os métodos de transfecção de células eucarióticas animais e inferiores são conhecidos. Vários métodos são utilizados para tornar as células eucarióticas competentes para a introdução do DNA tais como, mas não limitados a: precipitação com fosfato de cálcio, fusão da célula receptora com protoplastos bacterianos contendo o DNA, tratamento das células receptoras com lipossomos contendo o DNA, DEAE dextrina, eletroporação, biolística e microinjeção do DNA diretamente nas células. As células transfectadas são cultivadas utilizando meios bem-conhecidos na técnica (ver, Kuchler, R.J., Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. 1997).

Uma vez que um polipeptídeo da presente invenção é expresso este pode ser isolado e purificado das células utilizando métodos conhecidos pelos peritos na técnica . O processo de purificação pode ser monitorado utilizando técnicas de Western blot ou radioimunoensaio ou outras técnicas de ensaio imunológico padronizadas. As técnicas de purificação de proteínas são comumente conhecidas e utilizadas pelos versados na técnica (ver R. Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, Nova York 1982: Deutscher, Guide to Protein Purification, Academic Press (1990)). As modalidades da presente invenção fornecem um método de produção de uma proteína recombinante em que o vetor de expressão inclui um ou mais elementos incluindo uma sequência intensificadora do promotor, uma sequência marcadora para seleção, uma origem de replicação, uma sequência que codifica uma marcação de epítopo e uma sequência que codifica uma marcação para purificação por afinidade. Em uma modalidade específica, o constructo de ácido nucléico inclui uma sequência que codifica uma marcação de epítopo e a etapa de isolamento inclui uso de um anticorpo específico para a marcação do epítopo. Em uma outra modalidade espe-

cífica, o constructo de ácido nucléico contém uma sequência que compreende o poliaminoácido e a etapa de isolamento inclui uso de uma resina que compreende uma substância que se liga ao poliaminoácido, especificamente quando o poliaminoácido é polihistidina e a resina de ligação ao poliamino é uma resina de agarose carregada com níquel. Ainda em uma outra modalidade específica, o constructo de ácido nucléico contém uma sequência que codifica o polipeptídeo e a etapa de isolamento inclui o uso de uma resina que contém uma substância que se liga ao polipeptídeo, especificamente quando o polipeptídeo é um domínio de ligação com a quitina e a resina contém quitina-sepharose.

Os polipeptídeos da presente invenção podem ser sintetizados utilizando métodos de síntese não celulares conhecidos pelos peritos na técnica . As técnicas para síntese em fase sólida são descritas por Barany e Mayfield, Solid-Phase Peptide Synthesis, pp. 3-284 em the Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol.2, Special Methods in Peptide Synthesis, Parte A; Merrifield e outros, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-56 (1963) e Stewart e outros, Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed. Pierce Chem. Co., Rockford, IL (1984).

A presente invenção fornece ainda um método para a modificação (isto é, aumento ou diminuição) da concentração ou da composição dos polipeptídeos da invenção em uma planta ou uma parte da mesma. A modificação pode ser realizada através do aumento ou da diminuição da concentração e/ou da composição (isto é, da proporção dos polipeptídeos da presente invenção) em uma planta. O método compreendia a introdução em uma célula vegetal de um cassete de expressão compreendendo uma molécula de ácido nucléico da presente invenção ou um ácido nucléico que codifica as sequências das SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7, 9 como descrito anteriormente para a obtenção de uma célula ou um tecido vegetal transformado, cultivando a célula ou o tecido vegetal transformado. A molécula de ácido nucléico pode estar sob a regulação de um promotor constitutivo ou que pode ser induzido. O método pode compreender ainda a indução ou a repressão da expressão de uma molécula de ácido nucléico de uma sequência na planta

durante um período de tempo suficiente para modificar a concentração e/ou a composição na planta ou na parte da planta.

Uma planta ou uma parte da planta que possui expressão modificada de uma molécula de ácido nucléico da invenção pode ser analisada e selecionada utilizando métodos conhecidos pelos versados na técnica tais como, mas não limitados a Southern blot, sequênciamento de DNA ou análise de PCR utilizando iniciadores específicos à molécula de ácido nucléico e detectando os amplicons produzindos partindo da mesma.

Em geral, a concentração ou a composição é aumentada ou diminuída em pelo menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% em relação a uma planta, uma parte da planta de controle ou uma célula que não possui o cassete de expressão.

A capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio é uma característica essencial para as plantas e está positivamente correlacionada com o rendimento da planta de cultivo. Vários fatores bióticos e abióticos que consomem nitrogênio no solo criam frequentemente uma condição de crescimento com limitação de nitrogênio. Para lidar com isso, as plantas desenvolveram um conjunto de respostas adaptativas à limitação de nitrogênio. Entretanto, o conhecimento é limitado em relação às alterações fisiológicas e bioquímicas envolvidas nestas respostas adaptativas e nada era conhecido anteriormente em relação ao mecanismo molecular que controla a capacidade da planta de se adaptar à limitação de nitrogênio. A proteína do domínio RING descrita aqui está envolvida na mediação da resposta adaptativa das plantas à limitação de nitrogênio. A maior expressão deste gene pode produzir plantas com maior rendimento, particularmente uma vez que a manipulação da capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio pode levar à maior utilização de nitrogênio e alterar as relações fonte-escoadouro nas sementes, tubérculos, raízes e outros órgãos de armazenamento.

A invenção ser adicionalmente descrita com referência aos exemplos detalhados a seguir. Estes exemplos são fornecidos apenas com a finalidade de ilustração e não são pretendidos como sendo limitantes a não ser que seja especificado de outra maneira.

Exemplos

As técnicas de DNA recombinante e de clonagem molecular padronizadas utilizadas aqui são bem-conhecidas na técnica e são descritas por J. Sambrook e outros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001); by T.J. Silhavy, M.L. Berman e L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) e por Ausubel, F.M. e outros, Current Protocols in Molecular Biology, Nova York, John Wiley and Sons Inc., (1988), Reiter e outros, Methods in *Arabidopsis* Research, World Scientific Press (1992) e Schultz e outros, Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers (1998).

Exemplo 1

Condições de cultivo das plantas e isolamento do mutante *lines*

Uma coleção de linhagens mutantes de inserção de T-DNA homozigotas de *Arabidopsis* (na estrutura básica Columbia) foi identificada nos estoques de sementes ABRC. Em uma câmara de crescimento com condições ambientais controladas (23°C dia/18°C noite, com iluminação fluorescente de 150 μmoles/m^2·s, 16 h de luz/8 h de escuridão e 75% de umidade relativa), estas linhagens de T-DNA foram cultivadas no solo LB2 sem nutrientes (SunGro Horticultura Canada Ltd. BC. Canadá) suplementado com 3 ou 10 mM de nitrato de potássio na solução de nutrientes (10 mM de KH_2PO_4 pH 5,6, 2 mM de $MgSO_4$, 1 mM de $CaCl_2$, 0,1 mM de Fe-EDTA, 50 μM de H_3BO_4, 12 μM de $MnSO_4$, 1 μM de $ZnCl_2$, 1 μM de $CuSO_4$, 0,2 μM de Na_2MoO_4) uma vez por semana durante quatro semanas. Com base no fenótipo de senescência precoce induzido pelo baixo teor de nitrato, o mutante *lines* foi isolada destas linhagens de T-DNA.

Análise bioquímica

As 5ªs – 8ªs folhas das rosetas de plantas *lines* e Col cultivadas em solo LB2 com 3 mM de nitrato durante dias diferentes foram colhidas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a – 80°C para a análise bioquímica a seguir. O nitrato foi extraído das folhas congeladas e analisado de acordo com Clothern e outros, (1975). Os aminoácidos totais foram extra-

ídos sucessivamente com 80%, 50%, 0% de etanol em tampão HEPES-KOH (pH 7,4) e os sobrenadantes agrupados foram utilizados para a análise dos aminoácidos totais como descrito por Rosen (1957). Para extrair as proteínas solúveis, o pó de folhas congeladas foi suspenso em 100 mM de HEPES-KOH (pH 7,5) + 0,1% de tampão Triton X-100 e centrifugado a 14.000 rpm durante 10 min. O teor de proteínas solúveis totais nos sobrenadantes foram determinados utilizando o kit de análise de proteínas comercial (Bio-Rad, Hercules, CA). Para determinar o teor de nitrogênio, uma alíquota do pó de folhas congeladas foi seca a vacuo durante a noite e o nitrogênio total em 1,5 mg de pó seco foi medido através do método de análise de combustão Micro-Dumas utilizando o NA1500 C/H/N Analyzer (Carlo Erba Strumentazione, Milão, Itália). O açúcar solúvel foi extraído como descrito por Geiger e outros (1998) e analisado em relação ao teor de glicose, frutose e sacarose utilizando um kit disponível comercialmente (Megazyme, Irlanda). Para analisar a clorofila, o pó de folhas congeladas foi suspenso em 80% de acetona e centrifugado a 13.000 rpm. A extração foi repetida duas vezes e o teor de clorofila no sobrenadante agrupado foi medido de acordo com Arnon (1949). A antocianina foi extraída do pó de folhas congelado e determinada como descrito em Noh e Spalding (1998).

Análise da expressão por RT-PCR

O RNA total foi extraído de vários tecidos vegetais de *Arabidopsis* utilizando o reagente TriZol (Invitrogen). O cDNA do primeiro filamento foi sintetizado partindo de amostras de RNA total com um kit (Fermentas) e utilizado para a PCR. A expressão dos genes de *Arabidopsis* envolvidos no metabolismo de nitrato (*NR1, NR2, GS2, NRT1.1, NRT2.1*), na fotossíntese (*RBCS* e *CAB1*), na síntese de antocianina (*CHS*) e na senescência (*SAG12*), foi detectada através da RT-PCR semi-quantitativa e a expressão da *ubiquitina*-10 foi utilizada como o controle interno. Os iniciadores específicos e as condições da PCR para estes genes estão disponíveis quando necessário.

Clonagem baseada no mapa do gene *LINES*

Uma planta *lines* homozigota (na estrutura básica de Col) foi

cruzada com uma planta do tipo selvagem *Landsberg erecta*. Entre a progênie F2 segregante, que foi cultivada em solo LB2 com 3 mM de KNO_3, 518 plantas exibindo o fenótipo mutante *lines* foram selecionadas para o mapeamento baseado na PCR. O mapeamento de primeira rodada foi realizado de acordo com Lukowitz e outros (2000). Os marcadores SSLP e CAPS para o mapeamento fino posterior foram desenvolvidos partindo do banco de dados da sequência genômica de *Arabidopsis* (www.arabidopsis.org).

Produção de Plantas transgênicas de *Arabidopsis*

Para determinar se *At1g02860* é o gene *LINES*, a sequência codificadora de *At1g02860* foi amplificada através da RT-PCR utilizando um par de iniciadores *LINES*cDNA-F 5' ACA ACC GGT TTG AGG GCT GAA TTT GTT TG 3' (SEQ ID Nº: 11) e *LINES*cDNAR 5' ACA GAA TTC TAT ATC ATA TTC CAG TGA AGC T 3'(SEQ ID Nº: 12). O produto da PCR foi clonado nos sítios *Age* I e *EcoR* I no vetor binário pEGAD (Cutler e outros, 2000), no qual a expressão do cDNA de *At1g02860* será controlada pelo promotor 35S nas plantas. o constructo foi transformada em plantas mutantes *lines* como descrito por Clough e Bent (1998) e os transformantes foram verificados através do espalhamento das mudas T1 com o herbicida BASTA (diluição 1 : 500, Aventis, Strasbourg, França). As sementes T2 de três linhagens transgênicas T1 independentes foram semeadas no solo LB2 com 3 mM de nitrato para testar o fenótipo.

RESULTADOS

O mutante *lines* exibia fenótipo de senescência precoce induzido por baixo teor de nitrogênio inorgânico

O composto de nitrogênio inorgânico principal disponível para as plantas de cultivo sob a maior parte das condições de solo é o nitrato (Crawford e Forde, 2002). Para estudar como as plantas de *Arabidopsis* respondem à variação do suprimento de nitrato, foi estabelecido um sistema de cultivo em que 10 mM de nitrato fornece o nutriente nitrogênio suficiente para as plantas de *Arabidopsis*, enquanto que 3 mM de nitrato limita o crescimento de plantas de *Arabidopsis* significativamente (Bi e outros, 2005). Foram observadas as respostas adaptativas ao suprimento de nitrogênio insuficien-

te a seguir. As plantas de *Arabidopsis* que receberam suprimento de 3 mM de nitrato tiveram seu crescimento diminuído em 30% quando comparadas com aquelas que receberam suprimento com 10 mM de nitrato (Bi e outros, 2005) e exibiam um aumento na vermelhidão das folhas da roseta que indica o acúmulo de antocianina (Figuras 1A até C). Ainda, iniciavam o progresso de senescência nas folhas da roseta pelo menos duas semanas antes que as cultivadas com 10 mM de nitrato (dados não mostrados). Para selecionar mutantes com respostas de crescimento alteradas à condição de crescimento com limitação de nitrogênio, uma coleção de *lines* de inserção de T-DNA homozigotas foi identificada partindo dos estoques de sementes do *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC) (Alonso e outros, 2003) e cultivada no sistema de aplicação controlada de nitrato para avaliar seu desempenho de crescimento. Uma linhagem de inserção de T-DNA falhou em se aclimatar à condição de crescimento com limitação de nitrogênio e começou a senescência muito mais cedo e mais rapidamente que a do tipo selvagem quando fornecida com 3 mM de nitrato (Figura 1). Consequentemente, esta linhagem de inserção de T-DNA foi chamada de mutante *low inorganic nitrogênio-induced early senescence* (mutante de senescência precoce induzida por baixo teor de nitrogênio inorgânico) (*lines*). Mostradas nas Figuras 1 A até C, as plantas mutantes *lines* que receberam suprimento de 10 mM de nitrato tinham um padrão de crescimento e desenvolvimento similar ao do tipo selvagem. Quando a concentração de nitrato foi reduzida para 3 mM, as plantas *lines* começaram a senescência na 5ª folha da roseta 24 dias após a germinação (DAG) e depois deste ponto a senescência progrediu rapidamente com todas as folhas da roseta exibindo sintomas de senescência 26 DAG e as rosetas inteiras morrendo 32 DAG. Em contraste, as plantas do tipo selvagem não exibiam sintomas de senescência na 5ª folha da roseta até 32 DAG. Nas plantas do tipo selvagem, o processo de senescência continuou lentamente e gradualmente partindo da 5ª até a mais jovem folha da roseta e levou pelo menos duas semanas para que todas as folhas da roseta exibissem os sintomas da senescência. As folhas do caule nas plantas *lines* começaram a senescência 28 DAG, pelo menos 10 dias antes que as plan-

tas do tipo selvagem (Figura 1D). Ainda, as síliquas em desenvolvimento de *lines* iniciaram a senescência em suas extremidades 32 DAG, enquanto que as síliquas do tipo selvagem nunca exibiram sintomas de senescência ao longo de todo o seu desenvolvimento, mas acumularam antocianina abundante o que não foi observado nas síliquas de *lines* (Figura 1E). Com a redução da concentração de nitrato para 1 mM, a ocorrência do fenótipo de senescência nas folhas da roseta de plantas *lines* foi acelerada para 20 DAG e a senescência grave nas síliquas de *lines* em desenvolvimento resultou em sua morte em torno de 30 DAG sem produzir sementes viáveis. Sob a mesma condição de cultivo com 1 mM de nitrato, as plantas do tipo selvagem não começaram a senescência em suas folhas da roseta até 26 DAG e produziram síliquas fecundas (Figura 1C).

Para confirmar adicionalmente que o fenótipo de senescência precoce no mutante *lines* é dependente do suprimento insuficiente de nitrato, os inventores cultivaram plantas *lines* com 1 ou 3 mM de nitrato. Quando o sintoma de senescência tinha apenas iniciado nas 5as folhas das rosetas, estas plantas receberam o suprimento de 15 mM de nitrato. Consequentemente, o processo de senescência nas plantas *lines* em senescência foi interrompido com as folhas da roseta que sofreram senescência renovando seu crescimento e novas folhas da roseta ficando livres dos sintomas da senescência. Ainda, novas ramificações dos brotos laterais foram produzidas e nenhum sintoma de senescência foi observado nas folhas do caule e nas síliquas (Figuras 1F e G). Finalmente, as síliquas nestas plantas *lines* se tornaram fecundas depois de terem recebido suprimento de 15 mM de nitrato (Figura 1F).

Além do nitrato, outros fertilizandos de nitrogênio inorgânico incluem amônio e nitrato de amônio. Os inventores descobriram que o fenótipo de senescência precoce do mutante *lines* também era induzido pelo suprimento insuficiente de amônio e nitrato de amônio. As plantas *lines* cultivadas em 20 mM de amônio ou 10 mM de nitrato de amônio tinham um padrão de crescimento e desenvolvimento similar ao das plantas do tipo selvagem (dados não mostrados). Quando cultivadas em 5,0 mM de amônio ou 2,5 mM

de nitrato de amônio, as plantas *lines* começavam o processo de senescência nas folhas da roseta em torno de 24 DAG e subsequentemente a senescência ocorria rapidamente nas rosetas inteiras, nas folhas do caule e nas síliquas. Sob as mesmas condições de limitação de nitrogênio, as plantas do tipo selvagem não exibiam sintoma de senescência óbvio na 5ª folha da roseta até 32 DAG (dados não mostrados). Ainda, o fenótipo de senescência precoce induzido por amônio e nitrato de amônio insuficientes no mutante *lines* também podia ser recuperado através do suprimento de plantas *lines* em senescência com uma alta quantidade de amônio ou de nitrato de amônio (dados não mostrados). Uma vez que as três formas de nitrogênio inorgânico possuem o mesmo efeito sobre o mutante *lines*, os inventores utilizaram o nitrato como a fonte de nitrogênio nos experimentos a seguir.

Clonagem baseada no mapa do gene *LINES*

Para determinar a herança do fenótipo de senescência precoce induzido por baixo teor de nitrogênio inorgânico no mutante *lines*, os inventores fizeram um retrocruzamento do mutante *lines* com o tipo selvagem. As plantas F1 exibiam o mesmo fenótipo que as plantas do tipo selvagem quando cultivadas em 3 mM de nitrato. Na geração F_2, os fenótipos do tipo selvagem e do mutante *lines* segregaram em uma proporção de 3 : 1 (dados não mostrados), indicando que o fenótipo do mutante *lines* é recessivo e herdado na forma de uma única caratcerística Mendeliana. A análise de Southern blot revelou que o genoma do mutante *lines* continha cinco inserções de T-DNA, embora nenhum estivesse ligado geneticamente ao fenótipo de senescência precoce induzido pelo baixo teor de nitrogênio (dados não mostrados), indicando que o gene responsável no mutante *lines* não estava marcado por uma inserção de T-DNA. Subsequentemente, o mutante *lines* foi sucessivamente retrocruzado com o tipo selvagem quatro vezes com nenhuma inserção de T-DNA sendo deixada no mutante *lines*.

Devido ao fato de que o gene *LINES* não é marcado pela inserção de T-DNA no mutante *lines*, uma abordagem de clonagem baseado no mapa foi utilizada para isolar o *LINES*. Uma população de mapeamento F2 foi gerada através do cruzamento do mutante *lines* com *Landsberg erecta* do

tipo selvagem. O DNA genômico de 50 plantas mutantes *lines* F2 foi agrupado e utilizado para o mapeamento inicial com 22 marcadores de polimorfismos de comprimento de sequência simples (SSLP) de Lukowitz e outros (2000). Uma ligação íntima foi detectada entre *LINES* e o marcador de SSLP F21M12 no braço superior do cromossomo 1 (dados não mostrados). O mapeamento adicional com marcadores SSLP disponíveis adicionais (www.arabidopsis.org) localizou *LINES* em uma região que é delimitada por dois marcadores de SSLP NF21B7 e NT7I23 e coberta por sete BACs (Figura 2A). Utilizando dois marcadores de SSLP, foram identificados 18 recombinantes entre 518 plantas *lines* na população de mapeamento F2. O mapeamento fino com estes 18 recombinantes e mais SSLP e marcadores de sequência polimórfica amplificada clivada (CAPS) limitou a posição do lócus *LINES* em uma região genômica do marcador de SSLP 473993 e do marcador de CAPS SNP247 no clone BAC F22D16. Esta região tem aproximadamente 62,3 kb e contém 21 genes detalhados (Figura 2A). Treze genes poderiam ser o candidato para *LINES* e suas regiões codificadoras e suas sequências genômicas correspondentes foram amplificadas partindo de plantas mutantes *lines* através de RT-PCR e PCR, respectivamente. A comparação destes produtos da PCR com seus correspondentes do tipo selvagem descreveu que o único gene *At1g02860* foi reduzido nas sequências genômicas e codificadoras do mutante *lines* (Figuras 2C e D). O sequênciamento completo do gene AT1g02860 de *lines* mostrou que o terceiro íntron e o quarto éxo de *At1g02860* foram deletados no mutante *lines* (Figura 2A) e os éxons 3 e 5 remanescentes foram fundidos em quadro (Figura 2A). Isto resultou em um cDNA de *At1g02860* truncado no mutante *lines* (Figura 2D).

Para confirmar que o *At1g02860* é na verdade o gene *LINES*, o cDNA de *At1g02860* do tipo selvagem controlado pelo promotor 35S foi tranformado no mutante *lines*. As análises de PCR e RT-PCR descreveram três transformantes independentes que continham tanto a sequência genômica de *At1g02860* truncada (1,4 kb) quanto o cDNA de *At1g02860* transformado (1,0 kb) em seus genomas e, de forma correspondente, o mRNA de *At1g02860* truncado (0,9 kb) e do tipo selvagem (1,0 kb) (Figuras 2C e D).

Similares às plantas do tipo selvagem, os três transformantes não exibiam o fenótipo de senescência precoce quando recebiam suprimento de 3 mM de nitrato (Figura 2B). Em contraste, a planta *lines* de controle transformada com o vetor binário *pGEAD* vazio (Culter e outros, 2000) não expressava o cDNA de *At1g02860* do tipo selvagem (Figura 2D) e exibia o fenótipo de senescência precoce induzido pelo baixo teor de nitrogênio (Figura 2B). Todos os dados apontam de forma não ambígua o *At1g02860* como o gene *LINES* e o gene AT1g02860 mutado é responsável pelo fenótipo de senescência precoce induzido pelo baixo teor de nitrogênio no mutante *lines*.

LINES codifica uma ubiquitina E3 ligase do tipo RING

O gene *LINES* consiste em seis éxons e cinco íntrons e codifica uma proteína de 335 aminoácidos (Figuras 2A e 3A) com um peso molecular de 38.110 Daltons e um pI de 4,59. A proteína *LINES* carrega dois domínios conhecidos, RING e SPX (Figuras 3A e B). O domínio RING fica localizado nos aminoácidos 230-282 na proteína *LINES* e é um dedo de Zn do tipo C3HC4 que se liga com dois átomos de zinco e pode estar envolvida na mediação de interações proteína-proteína. Em *Arabidopsis*, a caracterização funcional de algumas proteínas que contêm RING tais como COP1 e SINATA5 sugere que a função biológica do domínio RING é participar na degradação das proteínas dependente de ubiquitina (Moon e outros, 2004) e desempenha assim uma função central e essencial na regulação de células eucarióticas (Glickman e Ciechanover, 2002). Stone e outros (2005) relataram que o genoma de *Arabidopsis* codifica 469 supostas proteínas que contêm RING, que podem ser agrupadas em oito tipos e *LINES* pertence ao tipo RING-HCa (Stone e outros, 2005). O domínio SPX fica no terminal N de *LINES* do aminoácido 1 até 180 (Figuras 3A e B). Este domínio recebeu esse nome por causa das proteínas SYG1 e PHO81 de levedura e da proteína XRP1 de mamífero, as quais todas contêm este domínio de 180 aminoácidos em seu terminal N. Embora a função biológica exata do domínio SPX seja desconhecida, a descoberta de que o terminal N da SYG1 de levedura pode se ligar diretamente com a subunidade beta da proteína G e suprimira transdução de sinal do feromônio de cruzamento (Spain e outros, 1995) su-

gere que as proteínas com o domínio SPX N-terminal podem estar envolvidas na transdução de sinal associada com a proteína G.

A comparação das sequências de aminoácidos das proteínas *LINES* mutadas e do tipo selvagem descreveu que o domínio RING estava deletado na proteína *LINES* mutada (Figuras 3A e B). Embora o restante da sequência de aminoácidos incluindo o domínio SPX da *LINES* truncada seja o mesmo que o do correspondente do tipo selvagem, a *LINES* truncada não poderia executar a função fisiológica de seu correspondente do tipo selvagem e assim resultava no fenótipo de senescência precoce induzido pelo baixo teor de nitrogênio. Ainda, para determinar se um domínio RING do tipo selvagem poderia recuperar o fenótipo de *lines*, os inventores expressaram um cDNA de *At1g02860* truncado N-terminal que codifica o domínio RING intacto, mas não o SPX nas plantas *lines*. Entretanto, todos os transformantes mantinham o fenótipo de senescência precoce dependente de baixo teor de nitrogênio (dados não mostrados). Estes resultados indicam que o domínio RING é uma parte muito essencial em *LINES* e não poderia ser separado do domínio SPX para sua função fisiológica.

Embora o genoma de *Arabidopsis* contenha aproximadamente 20 proteínas que contêm SPX (Wang e outros, 2004) e 469 proteínas que carregam RING, apenas *LINES* e NP_181426 codificadas por *At1g02860* e *At2g38920*, respectivamente, contêm ambos os domínios SPX e RING. As duas proteínas compartilham 41,2% de identidade de sequência e 61,7% similaridade. Há um mutante de inserção de T-DNA em *At2g38920* (SALK_129778). Entretanto, uma mutação homozigota neste gene não exibia o fenótipo de senescência precoce induzido pelo baixo teor de nitrogênio (dados não mostrados), indicando que o *At1g02860* é especificamente necessário para que as plantas de *Arabidopsis* se adaptem à condição de crescimento com limitação de nitrogênio. A comparação da sequência de aminoácidos deduzida de *LINES* com as depositadas no banco de dados atual descreve que *LINES* possui dois ortólogos no arroz (*Oryza sativa*), um em levedura de fissão (*Schizosascharomyces pombe*) e seis em fungos (Figura). A análise filogenética indica que *LINES* está relacionado mais intima-

mente a XP_479476 no arroz (Figura 3C). Entretanto, as funções biológicas de todos estes ortólogos de *LINES* ainda são desconhecidas.

O mutante *lines* não alterou sua capacidade de adquirir nitrogênio, mas ao invés disso, tinha um processo de senescência mediado pela limitação de nitrogênio alterado

Há duas razões possíveis para as plantas *lines* desenvolverem o fenótipo de senescência precoce induzido pelo baixo teor de nitrogênio inorgânico. Em primeiro lugar, as plantas *lines* podem adquirir menos nutriente nitrogênio que as do tipo selvagem quando o suprimento de nitrogênio é insuficiente. Para se dirigir a esta questão, os inventores verificaram o teor de nitrogênio total nas plantas do tipo selvagem e *lines*. Fornecidas com suprimento de nitrato alto (10 mM) ou baixo (3 mM), as plantas do tipo selvagem e *lines* 18 DAG eram similares uma com as outras em relação ao peso fresco (dados não mostrados) e à porcentagem de nitrogênio total (Figura 4A). Assim, o mutante *lines* se assemelha muito intimamente ao tipo selvagem em relação ao teor de nitrogênio total. Ainda, dois transportadores de nitrogênio principais, *NRT1.1* (transportador de nitrato de baixa afinidade) e *NRT2.1* (transportador de nitrato de alta afinidade), tinha níveis de expressão muito similares nas raízes de plantas do tipo selvagem e *lines* que receberam suprimento de 3 ou 10 mM de nitrato (Figura 4B). Estes resultados sugerem que as plantas *lines* e do tipo selvagem possuem capacidade similar de adquirir o nutriente nitrogênio seja o suprimento de nitrogênio alto ou baixo.

A segunda razão possível para que as plantas *lines* produzam o fenótipo de senescência precoce apenas quando o suprimento de nitrogênio é limitado pode ser o fato de que as plantas *lines* são prejudicadas no desenvolvimento de respostas adaptativas que possibilitam que as plantas de *Arabidopsis* se acostumem com a condição de crescimento com limitação de nitrogênio. Uma tal resposta adaptativa é a senescência mediada pela limitação de nitrogênio, que é essencial para mobilizar novamente o nutriente nitrogênio de folhas da roseta madura velha para órgãos em crescimento jovens e ativos, tais como folhas jovens e sementes imaturas (Thimann,

1980; Mei e Thimann, 1984). Portanto, o processo de senescência mediada pela limitação de nitrogênio nas folhas das rosetas do tipo selvagem e *lines* foi verificado em detalhes (Figura 4C). Cultivadas com 3 mM de nitrato, as plantas do tipo selvagem não exibiam sintoma de senescência nas 5as folhas das rosetas ou mais jovens até 32 DAG. A senescência progredia lentamente e era bem organizada, o que era indicado pelo fato de que as folhas das rosetas alteravam gradualmente sua coloração de verde para verde escuro e vermelho e mantinham sua turgescência ao longo de todo o processo de senescência. Nas plantas *lines* que receberam suprimento de 3 mM de nitrato, a senescência não somente começou muito mais cedo que no tipo selvagem, mas também progrediu muito rapidamente porque todas as folhas das rosetas exibiam sintomas de senescência 26 DAG e exibiam alteração de coloração das folhas abrupta e desaparecimento rápido da turgescência das folhas. Os limbos inferiores das folhas das folhas em senescência ainda estavam verdes e túrgidos, enquanto que as partes superiores já tinham morrido (Figura 4C). Ainda, as folhas em senescência não ficavam vermelhas partindo do verde e as folhas mortas eram marrons com alguma vermelhidão, indicando que um pouco de antocianina foi sintetizada durante o processo de senescência nas plantas *lines*.

SAG12 de *Arabidopsis* é um gene associado à senescência e foi definido como um marcador molecular de senescência autêntico (Noh e Amasino, 1999). Para tornar mais conveniente e acurado o rastreamento da ocorrência da senescência e tirar amostras de folhas das rosetas para análises bioquímicas neste estudo, os inventores determinaram a expressão de *SAG12* nas 5as – 8as folhas das rosetas de plantas do tipo selvagem e *lines* cultivadas com 3 mM de nitrato. Como mostrado na Figura 2D, a expressão de *SAG12* foi detectada nas plantas *lines* 24 dias DAG e aumentou com o progresso da senescência 28 DAG. Por outro lado, o *SAG12* nas plantas do tipo selvagem não foi expresso até 32 DAG e aumentou notavelmente 36 DAG quando a senescência grave ocorreu nas rosetas. O padrão de expressão do gene *SAG12* era coerente com o aparecimento do sintoma de senescência visual nos dois genótipos (Figura 4C), indicando que o nível de

expressão de *SAG12* na verdade reflete o processo de senescência nas folhas das rosetas.

O mutante *lines* continha altos níveis de metabólitos de nitrogênio enquanto falhava em acumular açúcares solúveis nas folhas das rosetas senescentes

Para fazer uso total do nitrogênio disponível sob condições em que este limita o crescimento, as plantas podem exportar nitrogênio de folhas e órgãos velhos para os jovens e em desenvolvimento. Portanto, a segunda resposta adaptativa à limitação de nitrogênio é a remobilização de nitrogênio partindo das folhas senescentes. A senescência e a morte rápidas das folhas das rosetas nas plantas *lines* podem impedir a remobilização de nitrogênio partindo destas folhas senescentes para as folhas, flores jovens e síliquas em desenvolvimento e assim podem resultar em um alto teor de metabólitos de nitrogênio nas folhas das rosetas de *lines*. Para testar esta hipótese, os níveis de nitrato, aminoácidos, proteínas solúveis e o teor de nitrogênio total foram determinados nas 5as – 8as folhas das rosetas das plantas do tipo selvagem e *lines* cultivadas sob a condição de limitação de nitrogênio ao longo de todo o processo de senescência. 18 DAG, antes do início da senescência, as plantas do tipo selvagem e *lines* continham quantidades muito similares dos três compostos que contêm N (Figuras 5A até C) e não diferiam significativamente em relação ao teor total de nitrogênio (Figura 5D). 32 DAG quando a senescência ocorria nas folhas das rosetas do tipo selvagem, o teor de nitrato, os aminoácidos totais, as proteínas solúveis e o nitrogênio total foram reduzidos em 75%, 80%, 75% e 70%, respectivamente, quando comparados com aqueles 18 DAG quando nenhum sintoma de senescência foi observado. Com a progressão da senescência nas folhas das rosetas do tipo selvagem 36 DAG, o nitrato, os aminoácidos totais, as proteínas solúveis e o teor de nitrogênio total foram diminuídos em 90%, 90%, 90% e 80%, respectivamente (Figuras 5A até D). Em contraste, a ocorrência (24 DAG) e a progressão (28 DAG) da senescência nas folhas das rosetas *lines* não foram acompanhadas por uma redução significativa nas quantidades de nitrato, de aminoácidos totais, de proteínas solúveis e de nitrogênio total (Figuras 5A até D). Por exemplo, quando a senescência gra-

ve ocorreu nas folhas das rosetas de *lines* 28 DAG, o teor de nitrato, os aminoácidos totais, as proteínas solúveis e o nitrogênio total foram diminuídos apenas em 33%, 5%, 20% e 6%, respectivamente, quando comparados com aqueles 18 DAG (Figuras 5A até D). Estes resultados sugerem que o nitrogênio é remobilizado das folhas das rosetas do tipo selvagem senescentes, enquanto o nitrogênio era mantido nas folhas senescentes de *lines*. Após a análise bioquímica, os inventores determinaram a expressão dos genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio através da RT-PCR. Como é mostrado na Figura 6, a expressão de *NR1, NR2 e GS2* foi diminuída com a ocorrência e o prosseguimento da senescência nas folhas das rosetas do tipo selvagem. Entretanto, isto não ocorria nas plantas *lines*, onde a expressão destes genes não foi alterada entre as folhas das rosetas colhidas antes ou depois da senescência ter ocorrido.

Foi observado que o acúmulo de açúcares solúveis, incluindo glicose, frutose e sacarose nas folhas está ligado fortemente à ocorrência de senescência nas folhas e à deficiência de nitrogênio (Paul e Driscoll, 1997; Wingler e outros, 2006). Os ensaios para açúcares solúveis mostraram que a glicose, a frutose e a sacarose se acumulavam notavelmente com o início e o progresso da senescência das folhas nas plantas do tipo selvagem, mas o teor dos três açúcares solúveis nas plantas *lines* tinha apenas um ligeiro aumento quando a senescência ocorria em suas folhas das rosetas (Figuras 5E até G). Por exemplo, 18 DAG quando a senescência das folhas não tinha sido iniciada, as plantas do tipo selvagem e *lines* tinham teor similar de glicose, frutose e sacarose. Quando a senescência das folhas ocorria, as quantidades de glicose, frutose e sacarose aumentava 90%, 84% e 46%, respectivamente, nas plantas do tipo selvagem (36 DAG), enquanto aumentava apenas 5%, 8% e 20%, respectivamente, nas plantas *lines* (28 DAG).

O mutante *lines* era defeituoso no acúmulo de antocianina e na capacidade de redução da fotossíntese durante a senescência

O acúmulo de antocianina e a redução da fotossíntese são duas respostas adaptativas importantes da limitação de nitrogênio e são controladas por vários QTLs em *Arabidopsis* (Diaz e outros, 2006). Para determinar

se as plantas *lines* poderiam desenvolver tais respostas adaptativas, as quantidades de antocianina e a capacidade de fotossíntese foram medidas nas plantas do tipo selvagem e *lines*. As plantas do tipo selvagem cultivadas sob limitação de nitrogênio aumentaram o teor de antocianina notavelmente durante o crescimento e a senescência (Figura 5H). 18 DAG, as 5as – 8as folhas das rosetas do tipo selvagem continham 4,8 unidades/g de peso fresco (FW) de antocianina e este aumentou até 31 unidades/g de FW 28 DAG quando as folhas das rosetas ainda não exibiam quaisquer sintomas de senescência. Com a ocorrência da senescência nas 5as – 8as folhas das rosetas das plantas do tipo selvagem 32 DAG, seu teor de antocianina aumentou para > 40 unidades/g de FW. Em contraste, o acúmulo de antocianina não ocorreu nas folhas das rosetas de *lines* em senescência (Figura 5H). 18 DAG quando as plantas *lines* não exibiam sintomas de senescência de forma molecular ou morfológica, estas continham 4,0 unidades/g de FW de antocianina. 24 DAG quando a senescência ocorria na 5^{a} – 8ª folhas das rosetas, estas continham ainda 3,5 unidades/g de FW de antocianina. Quando todas as folhas das rosetas exibiam sintoma grave de senescência nas plantas *lines* 28 DAG, não foi observado qualquer aumento no teor de antocianina (Figura 5H). De forma correspondente aos padrões diferentes de acúmulo de antocianina nas plantas do tipo selvagem e *lines*, o gene da chalcona sintase (*CHS*), que codifica a enzima que limita a taxa na via de síntese de antocianina, não aumentou seu nível de transcrição ao longo de todo o processo de senescência nas plantas *lines*, enquanto que a expressão do gene *CHS* aumentou notavelmente com o início e o progresso da senescência nas plantas do tipo selvagem (Figura 6).

A capacidade de fotossíntese das plantas pode ser indicada pelo teor de clorofila e o nível de expressão de dois genes marcadores da fotossíntese *RBCS* e *CAB* nas folhas, que codificam a subunidade pequena da Rubisco e a proteína de ligação à clorofila a/b, respectivamente (Martin e outros, 2002). O teor de clorofila foi analisado nas plantas do tipo selvagem e *lines* que receberam suprimento de nitrogênio limitado. Como é mostrado na Figura 5I, as plantas do tipo selvagem e *lines* continham 0,99 e 0,95 mg

de clorofila/g de FW 18 DAG, respectivamente. Com o início (32 DAG) e o progresso (36 DAG) da senescência nas plantas do tipo selvagem, o teor de clorofila diminuiu em 50% e 70%, respectivamente. Entretanto, o teor de clorofila foi reduzido apenas em 15% 28 DAG quando a senescência ocorreu de forma mais grave nas plantas *lines*. A análise de RT-PCR revelou que a expressão de *RBCS* e *CAB* era reduzida drasticamente quando a senescência mediada pelo baixo teor de nitrogênio ocorria nas folhas das rosetas do tipo selvagem 32 DAG (Figura 6). Em contraste, a expressão de *RBCS* e *CAB* nas plantas *lines* era coerentemente alta tanto antes quanto depois da senescência em suas folhas das rosetas (Figura 6). Estes dados indicam que, ao contrário das plantas do tipo selvagem, as plantas *lines* crescidas com nutriente nitrogênio limitado são defeituosas no acúmulo de antocianina e na redução da capacidade de fotossíntese, que são respostas adaptativas essenciais para a limitação de nitrogênio.

O mutante *lines* não é defeituoso nas vias de síntese de antocianina induzidas pela limitação de fósforo e pelo estresse de alto teor de sacarose

Além da limitação de nitrogênio, a limitação de fósforo e o estresse de alto teor de sacarose também induzem a síntese de antocianina nas plantas. Para determinar se o mutante *lines* é defeituoso no acúmulo de antocianina causada pela limitação de fósforo, as plantas mutantes *lines* e do tipo selvagem foram cultivadas com 0,5 mM de fósforo no solo. Foi observado que esta aplicação de fósforo limita significativamente o crescimento de plantas de *Arabidopsis*. 28 DAG quando as plantas mutantes *lines* crescidas com 3 mM de nitrato já exibiam o fenótipo de senescência precoce e defeito no acúmulo de antocianina, tanto as plantas mutantes *lines* quanto do tipo selvagem que receberam suprimento de 0,5 mM de fósforo aumentaram fortemente a síntese de antocianina e produziram aproximadamente 24 unidades/g de FW de antocianina. Ainda, as plantas mutantes *lines* crescidas tanto com nitrato (3 mM) quanto com fósforo (0,5 mM) limitantes não somente acumulavam uma alta quantidade de antocianina (20 unidades/g de FW) 28 DAG, mas também não exibiam o fenótipo de senescência precoce induzido pela limitação de nitrogênio. Para investigar se o alto teor de saca-

rose pode induzir o acúmulo de antocianina no mutante *lines*, tanto as plantas mutantes *lines* quanto do tipo selvagem foram cultivadas *in vitro* com 1 mM de nitrato e 3% ou 5% de sacarose. 21 DAG, os mutantes *lines* que receberam suprimento de 3% de sacarose produziram muito menos antocianina que o tipo selvagem e exibiam o fenótipo de senescência precoce. Em contraste, cultivadas com 5% de sacarose, as plantas *lines* acumularam a quantidade de antocianina similar à do tipo selvagem e não exibiam o fenótipo de senescência precoce. Todos os dados indicam que as vias de síntese de antocianina induzidas pela limitação de fósforo e pelo estresse de alto teor de sacarose não são afetadas pela mutação *lines* e o mutante *lines* é especificamente defeituoso na via de antocianina induzida pela limitação de nitrogênio. Estes resultados demonstram ainda que o acúmulo de antocianina no mutante *lines* pode prevenir eficientemente o fenótipo de senescência precoce induzido pela limitação de nitrogênio.

A *mutação lines* desviou a síntese de antocianina aumentada pela limitação de nitrogênio para a produção de lignina

A via de fenilpropanóide nas plantas se divide em duas ramificações na quarta etapa: uma é para a biossíntese de flavonóides e a outra é para a biossíntese de lignina. Nas plantas mutantes *lines* crescidas com 3 mM de nitrato, muitos genes estruturais envolvidas na síntese de lignina foram regulados para mais significativamente de 22 até 28 DAG. Este resultado e o decréscimo notável do acúmulo de antocianina induzido pela limitação de nitrogênio nas plantas mutantes *lines* sugerem que a mutação *lines* pode desviar a síntese de antocianina aumentada pela limitação de nitrogênio para a produção de lignina. Para confirmar esta hipótese, as plantas mutantes *lines* e do tipo selvagem foram cultivadas com 3 mM de nitrato e o teor de lignina nas inflorescências primárias foi analisado de 22 até 28 DAG. 22 DAG quando tanto as plantas mutantes *lines* quanto do tipo selvagem tinham inflorescência de 1-2 cm, as plantas do tipo selvagem não continham quase lignina, enquanto que a lignina era obviamente observada no mutante *lines*. 24 DAG antes da senescência precoce induzida pela limitação de nitrogênio ter ocorrido, as plantas mutantes *lines* ainda tinham muito mais lig-

nina que as do tipo selvagem. Com a senescência precoce iniciada e desenvolvida, as plantas mutantes *lines* diminuíram seu crescimento e tinham teor de lignina similar ao do tipo selvagem 28 DAG. Para manter o crescimento das plantas mutantes *lines* sob a condição de crescimento de limitação de nitrogênio, estas receberam suprimento de alto teor de dióxido de carbono (CO_2). Sob esta condição de crescimento, embora as plantas *lines* exibissem o fenótipo de senescência precoce e produzissem pouca antocianina 28 DAG, estas mantinham seu crescimento e continuavam a acumular lignina nos caules, o que resulta no fato de que as plantas mutantes *lines* contivessem muito mais lignina e tivessem uma estatura muito maior que as do tipo selvagem. Todos estes resultados indicam que o gene LINES está envolvido no controle da biossíntese de lignina e a mutação *lines* desvia a síntese de antocianina aumentada pela limitação de nitrogênio para a produção de lignina.

DISCUSSÃO

Tanto o nitrogênio quanto o fósforo são macronutrientes essenciais para o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Marschner, 1995). Em contraste com a resposta das plantas à limitação de nitrogênio, a sensibilidade à limitação de fósforo, a sinalização e a regulação gênica associada foram bem investigadas e entendidas nas plantas. Em *Arabidopsis*, as mutações nos genes PHO3, PSR1, PDR2 e PHR1 interromperam a sinalização da limitação de fósforo (Zakhleniuk e outros, 2001; Chen e outros, 2000, Ticconi e outros, 2004; Rubio e outros, 2001). AtSIZ1 regula a atividade de PHR1 e pode atuar a jusante da via de sensibilização da limitação de fósforo (Miura e outros, 2005). A evidência para a existência da sensibilidade e da via de sinalização da limitação de nitrogênio em organismos vivos vem de levedura e bactérias. Em levedura, a amônio permease Mep2p pode sentir a disponibilidade de nitrogênio no ambiente e gerar o sinal de limitação de nitrogênio para que a levedura regule seu crescimento e seu desenvolvimento para se acostumar com a condição de crescimento desfavorável (Lorenz e Heitman, 1998; Gagiano e outros, 2002; Biswas e Morschhäuser, 2005). Em bactérias, foi observado que as proteínas de transdução de sinal do tipo PII

desempenham uma função central na via de sinalização da limitação de nitrogênio com sua função e interação com outras proteínas sendo modificadas através de fosforilação, uridililação ou adenililação em resposta à condição de nitrogênio intracelular (deficiente ou suficiente) (Arcondeguy e outros, 2001; Schwarz e Forchhammer, 2005). Embora as plantas possuam os homólogos de Mep2p de levedura e de PII de bactéria, não possuem uma função similar na capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio nas plantas (Crawford e Forde, 2002; Moorhead e Smith, 2003). Neste estudo, os inventores apresentam dados fisiológicos, bioquímicos ou de genética molecular para demonstrar claramente que *LINES* é necessário para o desenvolvimento das respostas adaptativas à limitação de nitrogênio e é um componente essencial no mecanismo molecular que controla a capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio das plantas.

É sabido que o estresse de limitação de nitrogênio afeta notavelmente o crescimento e o desenvolvimento da planta, embora o conhecimento em relação à capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio da planta seja obscuro. Neste estudo, os inventores demonstram que as plantas de *Arabidopsis* são capazes de se acustumar com a condição de crescimento de limitação de nitrogênio através do desenvolvimento de um conjunto de respostas adaptativas à limitação de nitrogênio (Figuras 4 e 5). Em primeiro lugar, a capacidade de fotossíntese era reduzida. Esta resposta pode não somente diminuir notavelmente o requerimento das plantas pelo nutriente nitrogênio e também restringir a utilização de produtos da fotossíntese na síntese de moléculas contendo N, tais como aminoácidos, proteínas e ácidos nucléicos. Em segundo lugar, a síntese de antocianina era significativamente aumentada. O aumento neste pigmento que protege da luz permite que as plantas deficientes em nitrogênio evitem danos de fotoinibição causados pela limitação de nitrogênio (Bongue-Bartelsman e Phillops, 1995; Chalker-Scott, 1999). Em terceiro lugar, os açúcares solúveis que podem funcionar como o sinal para a senescência das folhas e para a deficiência de nitrogênio eram acumulados (Paul e Driscoll, 1997; Wingler e outros, 2006). Era sabido que a senescência das folhas era importante para a reciclagem

de nitrogênio em *Arabidopsis* porque mais de 80% do nitrogênio total nas folhas das rosetas maduras são exportados ao longo do processo de senescência (Himelblau e Amasino, 2001). Sob a condição de crescimento de limitação de nitrogênio, esta reciclagem de nitrogênio mediada pela senescência se torna mais importante para as plantas de *Arabidopsis* para a utilização eficientemente do nutriente nitrogênio limitado e é assim uma resposta adaptativa essencial à limitação de nitrogênio. Neste estudo, as plantas de *Arabidopsis* crescidas com suprimento limitado de nitrogênio começaram a senescência nas folhas das rosetas maduras velhas após entrarem no estágio de crescimento do caule e a senescência progrediu gradualmente das folhas das rosetas maduras mais velhas para as mais jovens (Figura 4). Concomitantemente, o teor de nitrogênio total e as quantidades de compostos contendo N tais como proteínas, aminoácidos e clorofila diminuíram notavelmente nas folhas das rosetas senescentes, indicando que o nitrogênio nestas folhas foi exportado para órgãos em desenvolvimento jovens tais como brotos florais e síliquas (Figura 5). De forma correspondente, como crescimento e o progresso de senescência causada pela limitação de nitrogênio nas plantas de *Arabidopsis*, os níveis de expressão dos genes envolvidos na fotossíntese e na assimilação de nitrogênio foram diminuídos e a transcrição de CHS, o gene limitante da taxa na síntese de antocianina, foi aumentada (Figura 6). Estas várias alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares envolvidas nas respostas adaptativas à limitação de nitrogênio nas plantas de *Arabidopsis* sugerem que a sensibilização ou a via de sinalização para a limitação de nitrogênio é ativada para ser iniciada de forma que uma resposta metabólica complicada reduza o nitrogênio.

O mutante *lines* desenvolve apenas o fenótipo de senescência precoce quando cultivado sob nitrogênio limitante e este fenótipo foi confirmado de três maneiras. Em primeiro lugar, as plantas *lines* cultivadas sob nitrogênio limitado (3 mM de nitrato) começaram a senescência nas folhas das rosetas pelo menos uma semana mais cedo que as plantas do tipo selvagem, enquanto que as plantas *lines* fornecidas com suprimento de nutriente de nitrogênio suficiente (10 mM de nitrato) eram similares às do tipo sel-

vagem em cada aspecto de crescimento e de desenvolvimento ao longo de todos os seus ciclos de vida (Figuras 1 A até C). Em segundo lugar, o fornecimento de suprimento de nutriente de nitrogênio suficiente (15 mM de nitrato) às plantas *lines* senescentes poderia interromper o programa de senescência (Figuras 1F e G). Em terceiro lugar, o mutante *lines* não exibe o fenótipo de senescência precoce quando exposto a condições de baixo teor de fósforo ou de alto teor de sacarose em combinação com baixo teor de nitrogênio.

O aparecimento do fenótipo de senescência precoce nas plantas *lines* sob limitação de nitrogênio poderia ser explicado por um defeito na aquisição de nitrogênio ou pela perda da capacidade de adaptação à condição de crescimento de limitação de nitrogênio. A primeira possibilidade foi excluída uma vez que as plantas *lines* e do tipo selvagem tinham teor de nitrogênio total muito similar quando 3 mM ou 10 mM de nitrato eram fornecidos (Figura 4A). Por outro lado, esta análise detalhada do mutante *lines* demonstrou claramente que todas as alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares essenciais para as respostas adaptativas à limitação de nitrogênio falharam em ocorrer nas plantas lines que receberam suprimento de nitrogênio limitado (Figura 4 até 6). Partindo do estágio vegetativo tardio para o reprodutivo, as plantas *lines* cultivadas com suprimento de nitrogênio limitado não acumulavam antocianina e possuíam apenas uma ligeira redução na fotossíntese e um pequeno aumento no teor de açúcares solúveis (Figura 5). De forma interessante, a incapacidade de acumular antocianina é acompanhada pelo maior acúmulo de lignina, que sugere que *LINES* regula o ponto de ramificação da biossíntese de fenilpropanóides entre a produção de lignina e a produção de antocianina.

A característica mais importante destas plantas *lines* era que estas passam por uma via de senescência causada pela limitação de nitrogênio visivelmente diferente daquela do tipo selvagem. Em primeiro lugar, a senescência nas plantas *lines* que receberam suprimento de nitrogênio limitado não somente começou muito mais cedo e progrediu mais rapidamente em todas as folhas das rosetas que a observada no tipo selvagem, mas isso

também ocorreu de forma brusca nos órgãos em crescimento ativo joves tais como folhas do caule e síliquas imaturas (Figura 4). Em segundo lugar, o teor de nitrogênio total e os compostos contendo N tais como proteínas e aminoácidos totais nas folhas *lines* senescentes eram apenas ligeiramente reduzidos com o início e o progresso da senescência nas folhas das rosetas *lines* (Figura 5), indicando que a remobilização de nitrogênio mediada pela senescência não ocorria nas folhas das rosetas *lines* senescentes. Isto também era manifestado pela senescência rápida nas folhas das rosetas jovens e dos caules e nas síliquas em desenvolvimento de *lines*, que é mais provavelmente causado por uma importação menor de nitrogênio. Ainda, os genes envolvidos na fotossíntese, na assimilação de nitrogênio e na síntese de antocianina não tinham níveis de expressão alterados durante a senescência nas plantas *lines*. Isto era significativamente diferente do que era observado nas plantas do tipo selvagem (Figura 6).

A falha do mutante *lines* de desenvolver estas respostas adaptativas essenciais à limitação de nitrogênio sugere fortemente que a mutação no gene *LINES* interrompe a sensibilização ou a via de sinalização de limitação de nitrogênio, de forma que o mutante *lines* não pode sentir ou sinalizar a condição de crescimento de limitação de nitrogênio. Ao invés disso, o mutante *lines* mantém uma condição fisiológica, bioquímica e molecular como se o suprimento de nitrogênio não fosse limitante.

O gene *LINES* foi identificado através de uma abordagem de clonagem baseada no mapa e foi mostrado que codifica uma ubiquitina ligase do tipo RING associada com o domínio SPX (Figuras 2 e 3). No mutante *lines*, o domínio RING foi deletado da proteína *LINES* e o truncamento de *LINES* causou o fenótipo de senescência precoce induzido pelo baixo teor de nitrogênio (Figura 2B). Um mutante com uma inserção de T-DNA no At2g38920, que é o único homólogo de *LINES* no genoma de *Arabidopsis*, não mostrou o fenótipo de *lines* quando recebeu suprimento de nitrogênio insuficiente, indicando adicionalmente que *LINES* é especificamente importante para o desenvolvimento das respostas adaptativas à limitação de nitrogênio em *Arabidopsis*. Entretanto, a ausência de um fenótipo pode refletir

a redundância conferida por *LINES*.

É sabido que a ubiquitinação das proteínas desempenha funções centrais na regulação de vários processos celulares em eucariotos. Em primeiro lugar, a via de ubiquitinação das proteínas se direciona a vários substratos tais como fatores de transcrição nucleares, proteínas citoplasmáticas anormais e proteínas reguladoras de vida curta para a degradação pelo proteassoma 26S (Glickman e Ciechanover, 2002). Em segundo lugar, a modificação das proteínas com ubiquitina também regula a localização, a atividade, os parceiros de interação e as funções das proteínas de uma maneira independente de proteassomas (Schnell e Hicke, 2003; Sun e Chen, 2004). A caracterização do mutante *lines* neste estudo demonstrou que o desenvolvimento de respostas adaptativas à limitação de nitrogênio em *Arabidopsis* envolvia várias alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares (Figuras 4 até 6), para as quais o processo celular responsável tal como a sensibilização e a sinalização da limitação de nitrogênio deve ser ativado. Com base na descoberta apresentada aqui de que *LINES* codifica uma ubiquitina ligase e que o nocaute de *LINES* resultou na falha do desenvolvimento de todas as respostas adaptativas essenciais à limitação de nitrogênio no mutante *lines*, pode ser levantada a hipótese de que *LINES* pode estar envolvido na degradação ou na modificação da(s) proteína(s) do substrato através da via de ubiquitinação das proteínas e a(s) proteína(s) do substrato pode(m) ser o(s) regulador(es) chave(s) negativo(s) na sensibilização ou na via de sinalização de limitação de nitrogênio. No mutante *lines*, este(s) regulador(es) negativo(s) não seria(m) ubiquinado(s) apropriadamente para a degradação ou para a modificação por causa da deleção do domínio RING de *LINES*.

Plantas de cultivo tal como o milho com uma grande capacidade de adaptação à limitação de nitrogênio são mais desejáveis nos países em desenvolvimento na América Latina, na África e na Ásia, onde os plantadores não podem arcar com os custos do grande fornecimento de nitrogênio embora a necessidade de alimentos seja muito alta (Loomis, 1997; Duvick, 1997). O entendimento do mecanismo molecular que controla a capacidade

de adaptação à limitação de nitrogênio das plantas irá esperançosamente acelerar o desenvolvimento de tais cultivares de plantas de cultivo. A clonagem e a caracterização funcional de *LINES* neste estudo não somente demonstram que as plantas estão equipadas com um mecanismo molecular para a adaptação à limitação de nitrogênio, mas também constituem uma primeira etapa na identificação dos componentes moleculares envolvidos no controle da sensibilização, da sinalização e da regulação gênica associada à limitação de nitrogênio da planta.

Tendo agora descrito as modalidades particulares da invenção através dos exemplos anteriores, que não são pretendidos como sendo limitantes, a invenção será agora adicionalmente apresentada nas reivindicações a seguir. Os versados na técnica reconhecerão que as reivindicações também permitem a inclusão de equivalentes além do âmbito literal das reivindicações.

REFERÊNCIAS

Alonso, J.M. e outros (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653-657.

Arcondeguy, T., Jack, R. e Merrick, M. (2001). P_{II} signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 80–105.

Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1–15.

Bi, Y.M., Zhang, Y., Signorelli, T., Zhao, R., Zhu, T., e Rothstein, S.J. (2005) Genetic analysis of Arabidopsis GATA transcription factor gene family reveals a nitrate-inducible member important for chlorophyll synthesis and glucose sensitivity. *Plant J.* 44: 680-92.

Biswas, K. e Morschhäuser, J. (2005) The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in Candida albicans. *Mol. Microbiol.* 56:3, 649-669.

Bongue-Bartelsman, M. e Phillips, D.A. (1995) Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiol. Biochem.* 33: 539–546.

Castleberry, R.M., Crum, C.W. e Krull, F. (1984) Genetic yield improvement of U.S. maize cultivars under varying fertility and climatic environments. *Crop Sci.* 24: 33–36.

Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, T.E. e Youngs, V.L. (1975) Rapidcolorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitrationof salicylic acid. *Commun. Soil Sci. and Plant Anal.* 6: 71–80.

Chalker-Scott, L. (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem. Photobiol.* 70: 1–9.

Chen, D. L., Delatorre, C. A., Bakker, A. e Abel, S. (2000) Conditional identification of phosphate-starvation-response mutants in Arabidopsis thaliana. *Planta* 211: 13–22.

Clough, S.J. e Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 16: 735-743.

Crawford, N.M. (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. Plant Cell 7: 859-68.

Crawford, N.M. e Forde, B.G. (2002) Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. Em: Meyerowitz, E. e Somerville, C. eds, The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0011, http://www.aspb.org/publications/arabidopsis

Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffitts, J.S. e Somerville, C.R. (2000) Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of Arabidopsis at a high frequency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 3718-3723.

Diaz, C., Purdy, S., Christ, A., Morot-Gaudry, J.-F., Wingler, A. e Masclaux-Daubresse, C. (2005) Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in Arabidopsis. A metabolic profiling approach. *Plant Physiol.* 138: 898–908.

Diaz, C., Saliba-Colombani, V., Loudet, O., Belluomo, P., Moreau, L., Daniel-Vedele, F., Morot-Gaudry, J.F. e Masclaux-Daubresse, C. (2006) Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in Arabidopsis thalia-

na. Plant Cell Physiol. 47: 74-83.

Ding, L., Wang, K.J., Jiang, G.M., Biswas, D.K., Xu, H., Li, L.F. e Li, Y.H. (2005) Effects of nitrogen deficiency on photosynthetic traits of maize hybrids released in different years. Ann Bot (Lond). 96: 925-930.

Duvick, D.N. (1984) Genetic contributions to yield gains of U.S. hybrid maize, 1930 to 1980. Em: Fehr, W.R., ed. Genetic contributions to yield gains of five major crop plants. CSSA Special Publication 7. Madison, WI: ASA and CSSA,15-47.

Duvick, D.N. (1997) Review of the symposium on developing drought and low-N tolerant maize. Em: Edmeades, G,O., Banziger, M., Mickelson, H,R. and Pena-Valdicia, C,B. eds. Developing drought and low N-tolerant maize. El Batan, Mexico: CIMMYT, 554-556.

Feller, U. e Fischer, A. (1994) Nitrogen metabolism in senescing leaves. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 241–273.

Filleur, S., Dorbe, M.F., Cerezo, M., Orsel, M., Granier, F., Gojon, A. e Daniel-Vedele, F. (2001). An arabidopsis T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Lett.* 489: 220–224.

Frink, C.R., Waggoner, P.E. e Ausubel, J.H. (1999) Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 1175–1180.

Gagiano, M., Bauer, F.F. e Pretorius, J.S. (2002) The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Yeast Res.* 2: 433-470.

Geiger, M., Walch-Liu, P., Engels, C., Harnecker, J., Schulze, E.-D., Ludewig, F., Sonnewald, U., Scheible, W.-R. e Stitt, M. (1998) Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant, Cell & Environ.* 21: 253-268.

Glickman, M.H. e Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 82: 373–428

Good, A.G., Shrawat, A.K. e Muench, D.G. (2004) Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends Plant Sci.* 9: 597-605.

Himelblau, E. e Amasino, R.M. (2001) Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *J. Plant Physiol.* 158: 1317–1323.

Khamis, S., Lamaze, T., Lemoine, Y. e Foyer, C. (1990) Adaptation of the photosynthetic apparatus in maize leaves as a result of nitrogen limitation. *Plant Physiol.* 94: 1436–1443.

Kolber, Z., Zehr, J. e Falkowski, P. (1988) Effects of Growth Irradiance and Nitrogen Limitation on Photosynthetic Energy Conversion in Photosystem II. *Plant Physiol.* 88: 923-929.

Lam, H.M., Coschigano, K.T., Oliveira, I.C., Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G.M. (1996) The Molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 569-593.

Loomis, R.S. (1997) Developing drought and low-nitrogen tolerant maize: an overview. Em: Edmeades, G.O., Banziger, M., Mickelson, H.R. e Pena-Valdicia, C.B. eds. Developing drought and low N-tolerant maize. El Batan, Mexico: CIMMYT, 552-555.

Lukowitz, W., Gillmor, C.S. e Scheible, W. (2000) Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol.* 123, 795-805.

Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. London: Academic press.

Martin, T., Oswald, O. e Graham, I.A. (2002) *Arabidopsis* seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. *Plant Physiol.* 128: 472–481

McCullough D.E., Girardin, Ph., Mihajlovic, M., Aguilera, A. e Tollenaar, M. (1994) Influence of N supply on development and dry matter accumulation of an old and a new maize hybrid. *Can. J. Plant Sci.* 74:471-477.

Masclaux, C., Valadier, M., Brugière, N., Morot-Gaudry, J. e Hi-

rel, B. (2000) Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta* 211: 510–518.

Mei, H.S. e Thimann, K.V. (1984) The relation between nitrogen deficiency and leaf senescence. *Physiol. Plant.* 62: 157-161.

Miura, K., Rus ,A., Sharkhuu, A., Yokoi, S., Karthikeyan, A.S., Raghothama, K.G., Baek, D., Koo, Y.D., Jin, J.B., Bressan, R.A., Yun, D.J. e Hasegawa, P.M. (2005) The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102: 7760-7765.

Moon, J., Parry, G. e Estelle, M. (2004) The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell* 16: 3181-95.

Moorhead, G.B. e Smith, C.S. (2003) Interpreting the plastid carbon, nitrogen, and energy status. A role for PII? *Plant Physiol.* 133: 492-492.

Noh, B. e Spalding, E.P. (1998) Anion channels and the stimulation of anthocyanin accumulation by blue light in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiol.* 116: 503-9.

Noh, Y.S. e Amasino, R.M. (1999) Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Mol Biol.* 41: 181-94.

Nolden, L., Ngouoto-Nkili, C.E., Bendt, A.K., Kramer, R. e Burkovski, A. (2001) Sensing nitrogen limitation in Corynebacterium glutamicum: the role of glnK and glnD. *Mol. Microbiol.* 42:1281-95.

Ono, K., Terashima, I. e Watanabe, A. (1996) Interaction between nitrogen deficit of a plant and nitrogen content in the old leaves. *Plant and Cell Physiol.* 37: 1083–1089.

Paul, M.J. e Driscoll, S.P. 1997. Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signalling nitrogen deficiency through source:sink imbalance. *Plant, Cell & Environ.* 20: 110–116.

Peoples, M.B. Gault, R.R., Lean, B., Sykes, J.D. e Brockwell, J. (1995) Minimizing gaseous losses of nitrogen. Em: Bacon, PE. ed, Nitrogen Fertilizer in the Environment, Marcel Dekker, pp. 565–606.

Rogers, A., Fischer, B.U., Bryant, J., Frehner, M., Blum, H., Raines, C.A. e Long, S.P. (1998). Acclimation of photosynthesis to elevated CO_2 under low-nitrogen nutrition is affected by the capacity for assimilate utilization. Perennial ryegrass under free-air CO_2 enrichment. *Plant Physiol.* 118: 683–689.

Rosen, H. (1957) A modified ninhydrin colorimetric analysisfor amino acids. *Arch. Biochem. Biophy.* 67: 10–15.

Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martin, A. C., Iglesias, J., Leyva, A. e Pa-Ares, J. (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* 15: 2122–2133.

Schnell, J.D. e Hicke, L. (2003) Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 278: 35857–35860

Spain, B.H., Koo, D., Ramakrishnan, M., Dzudzor, B. e Colicelli, J. (1995) Truncated forms of a novel yeast protein suppress the lethality of a G protein alpha subunit deficiency by interacting with the beta subunit. *J. Biol. Chem.* 270: 25435-44.

Stitt, M. (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 178-86.

Stone, S.L., Hauksdottir, H., Troy, A., Herschleb, J., Kraft, E. e Callis, J. (2005) Functional analysis of the RING-type ubiquitin ligase family of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 137: 13–30.

Sun, L. e Chen, Z.J. (2004) The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 119–126.

Thimann, K.V. (1980) Senescence in leaves. Em: Thimann, K.V. ed. Senescence in Plants, C.R.C. Press, Boca Ration, FL. 85-115.

Ticconi, C. A., Delatorre, C. A., Lahner, B., Salt, D. E. e Abel, S. (2004) Arabidopsis pdr2 reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. *Plant J.* 37: 801–814.

Todd, C.D., Zeng, P., Huete, A.M., Hoyos, M.E. e Polacco, J.C. (2004) Transcripts of MYB-like genes respond to phosphorous and nitrogen deprivation in Arabidopsis. *Planta* 219: 1003-1009.

Tollenaar, M. e Wu, J. (1999) Yield improvement in temperate maize is attributable to greater stress tolerance. *Crop Sci.* 39: 1597–1604

Van Nuland, A., Vandormael, P., Donaton, M., Alenquer, M., Lourenço, A., Quintino, E., Versele, M. e Thevelein, J.M. (2006) Ammonium permease-based sensing mechanism for rapid ammonium activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Mol. Microbiol.* 59: 1485-1505.

Vitousek, P.M. e Howarth, R.V. (1991) Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? *Biogeochemistry* 13: 85–115.

Wang, Y., Ribot, C., Rezzonico, E. e Poirier, Y. (2004) Structure and expression profile of the Arabidopsis PHO1 gene family indicates a broad role in inorganic phosphate homeostasis. *Plant Physiol.* 135: 400-11.

Wingler, A., Purdy, S., MacLean, J.A. e Pourtau, N. (2006) The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 57: 391-9.

Zakhleniuk, O. V., Raines, C. A. e Lloyd, J. C. (2001) pho3: a phosphorus-deficient mutant of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Planta* 212: 529–534.

Listagem de Sequências

<110> University of Guelph

Rothstein, Steven

Peng, Mingsheng

Bi, Yong-Mei

<120> GENE E PROTEÍNA PARA CAPACIDADE DE ADAPTAÇÃO À LIMITAÇÃO DE NITROGÊNIO E MODULAÇÃO DOS MESMOS

<130> 6580-350

<150> 60/812,981

<151> 2006-06-13

<160> 12

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 1008

<212> DNA

<213> Arabidopsis

<400> 1

atgaagtttt gtaagaagta tgaagagtac atgcaaggac agaaggagaa gaagaatctt 60

cctggtgttg ggtttaagaa actcaagaag attctcaaga gatgcaggag aaatcatgtt 120

ccttctagaa tttcttttac tgatgcaatc aaccacaatt gttctcgtga atgcccagtt 180

tgtgatggga ctttttttccc ggagcttctc aaggaaatgg aagatgttgt tggatggttt 240

aacgagcatg ctcagaagct tcttgagctt catttagctt ctggttttac aaagtgtctt 300

acttggctca gaggcaacag tcgaaaaaag gaccatcatg gtttgatcca agagggtaaa 360

gatttggtta attacgctct catcaatgcc gtcgccattc gaaaaatcct caagaaatat 420

gacaagattc atgagtctag gcaaggacaa gcgtttaaga ctcaggtcca gaaaatgcga 480

atagaaatcc ttcagtcacc gtggctctgc gagcttatgg cgtttcacat caatctgaaa 540

gaatctaaga aggaatctgg agctactata acttctcctc ctcctcctgt tcatgcattg 600

tttgatggtt gcgctttgac tttcgacgat gggaagcctt tactttcctg cgagctctct 660

gattccgtca aagttgacat tgacttgact tgttcaatat gcctggacac ggtgtttgat 720

ccaatatctc taacctgcgg tcacatatat tgctacatgt gtgcttgctc tgctgcatca 780

gtaaacgtag ttgatggctt gaaaaccgca gaagcaactg aaaaatgccc gctttgccgt 840

gaggatgggg tttataaagg tgctgttcac ttggatgagc tcaatatttt acttaagcga 900

agctgcagag actattggga agaaaggcgt aaaacagaga gagcagaaag gttacaacaa 960

gcaaaggaat attgggatta ccaatgccga agcttcactg gaatatga 1008

<210> 2

<211> 335

<212> PRT

<213> Arabidopsis

<400> 2

Met Lys Phe Cys Lys Lys Tyr Glu Glu Tyr Met Gln Gly Gln Lys Glu
1 5 10 15

Lys Lys Asn Leu Pro Gly Val Gly Phe Lys Lys Leu Lys Lys Ile Leu
20 25 30

Lys Arg Cys Arg Arg Asn His Val Pro Ser Arg Ile Ser Phe Thr Asp
35 40 45

Ala Ile Asn His Asn Cys Ser Arg Glu Cys Pro Val Cys Asp Gly Thr
50 55 60

Phe Phe Pro Glu Leu Leu Lys Glu Met Glu Asp Val Val Gly Trp Phe
65 70 75 80

Asn Glu His Ala Gln Lys Leu Leu Glu Leu His Leu Ala Ser Gly Phe
85 90 95

Thr Lys Cys Leu Thr Trp Leu Arg Gly Asn Ser Arg Lys Lys Asp His
100 105 110

His Gly Leu Ile Gln Glu Gly Lys Asp Leu Val Asn Tyr Ala Leu Ile
115 120 125

Asn Ala Val Ala Ile Arg Lys Ile Leu Lys Lys Tyr Asp Lys Ile His
130 135 140

Glu Ser Arg Gln Gly Gln Ala Phe Lys Thr Gln Val Gln Lys Met Arg
145 150 155 160

Ile Glu Ile Leu Gln Ser Pro Trp Leu Cys Glu Leu Met Ala Phe His
165 170 175

Ile Asn Leu Lys Glu Ser Lys Lys Glu Ser Gly Ala Thr Ile Thr Ser
180 185 190

Pro Pro Pro Pro Val His Ala Leu Phe Asp Gly Cys Ala Leu Thr Phe

195 200 205

Asp Asp Gly Lys Pro Leu Leu Ser Cys Glu Leu Ser Asp Ser Val Lys

210 215 220

Val Asp Ile Asp Leu Thr Cys Ser Ile Cys Leu Asp Thr Val Phe Asp

225 230 235 240

Pro Ile Ser Leu Thr Cys Gly His Ile Tyr Cys Tyr Met Cys Ala Cys

245 250 255

Ser Ala Ala Ser Val Asn Val Val Asp Gly Leu Lys Thr Ala Glu Ala

260 265 270

Thr Glu Lys Cys Pro Leu Cys Arg Glu Asp Gly Val Tyr Lys Gly Ala

275 280 285

Val His Leu Asp Glu Leu Asn Ile Leu Leu Lys Arg Ser Cys Arg Asp

290 295 300

Tyr Trp Glu Glu Arg Arg Lys Thr Glu Arg Ala Glu Arg Leu Gln Gln

305 310 315 320

Ala Lys Glu Tyr Trp Asp Tyr Gln Cys Arg Ser Phe Thr Gly Ile

325 330 335

<210> 3

<211> 870

<212> DNA

<213> Arabidopsis

<400> 3

atgaagtttt gtaagaagta tgaagagtac atgcaaggac agaaggagaa gaagaatctt 60

cctggtgttg ggtttaagaa actcaagaag attctcaaga gatgcaggag aaatcatgtt 120

ccttctagaa tttcttttac tgatgcaatc aaccacaatt gttctcgtga atgcccagtt 180

tgtgatggga ctttttccc ggagcttctc aaggaaatgg aagatgttgt tggatggttt 240

aacgagcatg ctcagaagct tcttgagctt catttagctt ctggttttac aaagtgtctt 300

acttggctca gaggcaacag tcgaaaaaag gaccatcatg gtttgatcca agagggtaaa 360

gatttggtta attacgctct catcaatgcc gtcgccattc gaaaaatcct caagaaatat 420

gacaagattc atgagtctag gcaaggacaa gcgtttaaga ctcaggtcca gaaaatgcga 480

atagaaatcc ttcagtcacc gtggctctgc gagcttatgg cgtttcacat caatctgaaa 540

gaatctaaga aggaatctgg agctactata acttctcctc ctcctcctgt tcatgcattg 600

tttgatggtt gcgctttgac tttcgacgat gggaagcctt tactttcctg cgagctctct 660

gattccgtca aagttgacat tgacttgact tgttcaatat gcctggatgg ggtttataaa 720

ggtgctgttc acttggatga gctcaatatt ttacttaagc gaagctgcag agactattgg 780

gaagaaaggc gtaaaacaga gagagcagaa aggttacaac aagcaaagga atattgggat 840

taccaatgcc gaagcttcac tggaatatga 870

<210> 4

<211> 289

<212> PRT

<213> Arabidopsis

<400> 4

Met Lys Phe Cys Lys Lys Tyr Glu Glu Tyr Met Gln Gly Gln Lys Glu
1 5 10 15

Lys Lys Asn Leu Pro Gly Val Gly Phe Lys Lys Leu Lys Lys Ile Leu
20 25 30

Lys Arg Cys Arg Arg Asn His Val Pro Ser Arg Ile Ser Phe Thr Asp
35 40 45

Ala Ile Asn His Asn Cys Ser Arg Glu Cys Pro Val Cys Asp Gly Thr
50 55 60

Phe Phe Pro Glu Leu Leu Lys Glu Met Glu Asp Val Val Gly Trp Phe
65 70 75 80

Asn Glu His Ala Gln Lys Leu Leu Glu Leu His Leu Ala Ser Gly Phe
85 90 95

Thr Lys Cys Leu Thr Trp Leu Arg Gly Asn Ser Arg Lys Lys Asp His
100 105 110

His Gly Leu Ile Gln Glu Gly Lys Asp Leu Val Asn Tyr Ala Leu Ile
115 120 125

Asn Ala Val Ala Ile Arg Lys Ile Leu Lys Lys Tyr Asp Lys Ile His
130 135 140

Glu Ser Arg Gln Gly Gln Ala Phe Lys Thr Gln Val Gln Lys Met Arg
145 150 155 160

Ile Glu Ile Leu Gln Ser Pro Trp Leu Cys Glu Leu Met Ala Phe His
165 170 175

Ile Asn Leu Lys Glu Ser Lys Lys Glu Ser Gly Ala Thr Ile Thr Ser
180 185 190

Pro Pro Pro Pro Val His Ala Leu Phe Asp Gly Cys Ala Leu Thr Phe
195 200 205

Asp Asp Gly Lys Pro Leu Leu Ser Cys Glu Leu Ser Asp Ser Val Lys
210 215 220

Val Asp Ile Asp Leu Thr Cys Ser Ile Cys Leu Asp Gly Val Tyr Lys
225 230 235 240

Gly Ala Val His Leu Asp Glu Leu Asn Ile Leu Leu Lys Arg Ser Cys
245 250 255

Arg Asp Tyr Trp Glu Glu Arg Arg Lys Thr Glu Arg Ala Glu Arg Leu
260 265 270

Gln Gln Ala Lys Glu Tyr Trp Asp Tyr Gln Cys Arg Ser Phe Thr Gly
275 280 285

Ile

<210> 5

<211> 1508

<212> DNA

<213> Arabidopsis

<400> 5

agctgatatg gtttgtataa caaaacccta aaaataccgt gattaagata aaaagcaaaa 60

caaaacccta aaaatagaaa ttacaatacc caataaagtt aatagcgact ttaatcggta 120

gagatttcgt cttcctccac cagcttctgt tgttcttaat cactagatcc cttgtttttg 180

acgtgacgaa aagcctgaga ttgaaatttg tgtactatgt tagaagatga agtttggtga 240

gacgttcacg gaatatctac atggagaaga ggaatggttc ctggagaagt gtcgcttcgt 300

tgaatataag aaacttaaga aagtgttgaa gaagtgcaag acatgtaact ctacaaaatc 360

tgatgatgga caaatcatcc catctgctac ttcttcatct ttgtctgatt catgcgaatg 420

caaagcttgc ccttggtgtg atcagatgtt cttcgaggag ctgatgaaag aagctactga 480

catagcggga tttttcaggt caagagtgag gcatcttctc catcttcatg tagccactgg 540

gatgcagaga tacatgattc gcctacgcag atgcttcact gacgaaaaac aagctttagt 600

ccaagagggc caaatcttga ttcaatacat caccatgaat gcaattgcta tccgtaaaat 660

cctcaagaaa tatgacaagg tgcatagctc agagaatggg aagaatttca agttgaaaat 720

gcgagcggag cgcatagagc tcttgcactc accatggctc atagaacttg gagcctttta 780

tctcaactct gggctagata atgttggaaa cttcaagaat tcgtttggcc gtgtcgcttg 840

tgaaaatctc aacgaagatc aaccagtgct aaaactcatg ctgcctaact caatagagct 900

ggagtatgat ctaacttgtg caatctgcct cgaaacggta ttcaatccct atgctttaaa 960

gtgcggtcac atattttgta actcgtgtgc atgctcggct gcttctgtat tgattttcca 1020

aggcattaaa gcagcgcccc gacattcaaa atgtcccatc tgcagagagg ctggagttta 1080

cgcggaagca gttcacatga tcgagctgca tcttctttta aagacacgaa gcaaagaata 1140

ttggaaggag aggatgatga atgaacggtc tgagatggtg aagcagtcga agatgttttg 1200

gaatgaacag acgaagcata tgatcggtta ttaatggtgt atctcttcaa gttcaattat 1260

taacttcatc taaacaaaag gtgatgacaa aaaaaaagat atattacttt tatttgtttc 1320

tgccgtgccc gagacattac agattcgaga gagaatcata attaggagag gtttatttta 1380

ttttttttct ttggtgagac ataaatcgag ttgtgtttaa atacttttt gtgttgttta 1440

agatgttatt ggatgttgtt ccttattaat tgtttaaaag acaagtcaat agattacaca 1500

cgttcatc 1508

<210> 6

<211> 335

<212> PRT

<213> Arabidopsis

<400> 6

Met Lys Phe Gly Glu Thr Phe Thr Glu Tyr Leu His Gly Glu Glu Glu

1 5 10 15

Trp Phe Leu Glu Lys Cys Arg Phe Val Glu Tyr Lys Lys Leu Lys Lys

20 25 30

Val Leu Lys Lys Cys Lys Thr Cys Asn Ser Thr Lys Ser Asp Asp Gly

35 40 45

Gln Ile Ile Pro Ser Ala Thr Ser Ser Ser Leu Ser Asp Ser Cys Glu

50 55 60

Cys Lys Ala Cys Pro Trp Cys Asp Gln Met Phe Phe Glu Glu Leu Met

65 70 75 80

Lys Glu Ala Thr Asp Ile Ala Gly Phe Phe Arg Ser Arg Val Arg His

85 90 95

Leu Leu His Leu His Val Ala Thr Gly Met Gln Arg Tyr Met Ile Arg

100 105 110

Leu Arg Arg Cys Phe Thr Asp Glu Lys Gln Ala Leu Val Gln Glu Gly

115 120 125

Gln Ile Leu Ile Gln Tyr Ile Thr Met Asn Ala Ile Ala Ile Arg Lys

130 135 140

Ile Leu Lys Lys Tyr Asp Lys Val His Ser Ser Glu Asn Gly Lys Asn

145 150 155 160

Phe Lys Leu Lys Met Arg Ala Glu Arg Ile Glu Leu Leu His Ser Pro

165 170 175

Trp Leu Ile Glu Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Asn Ser Gly Leu Asp Asn

180 185 190

Val Gly Asn Phe Lys Asn Ser Phe Gly Arg Val Ala Cys Glu Asn Leu

195 200 205

Asn Glu Asp Gln Pro Val Leu Lys Leu Met Leu Pro Asn Ser Ile Glu

210 215 220

Leu Glu Tyr Asp Leu Thr Cys Ala Ile Cys Leu Glu Thr Val Phe Asn

225 230 235 240

Pro Tyr Ala Leu Lys Cys Gly His Ile Phe Cys Asn Ser Cys Ala Cys

245 250 255

Ser Ala Ala Ser Val Leu Ile Phe Gln Gly Ile Lys Ala Ala Pro Arg

260 265 270

His Ser Lys Cys Pro Ile Cys Arg Glu Ala Gly Val Tyr Ala Glu Ala

275 280 285

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

290 295 300

Tyr Trp Lys Glu Arg Met Met Asn Glu Arg Ser Glu Met Val Lys Gln

305 310 315 320

Ser Lys Met Phe Trp Asn Glu Gln Thr Lys His Met Ile Gly Tyr

325 330 335

<210> 7

<211> 1696

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 7

ttcgtttcac cctgctcgga aaaaaaatcc taaaagctta atttctttct ttgttcttat 60

tactgtctca cgtgagacgc ctgagctcaa ctgaatttct ggccccctct tcatctccgt 120

gagcttcgct gccctttttc tttgccttct cttggtggtt taatttcatc agttttcctc 180

catttccttc tttagccatt gttccgattg ccgtctcttg ttgcatgtgc attccttctc 240

tgaaccgtgc ccccccaatt cgtccgcgag ctatacaaat ttggattcgt tttgttcgtt 300

tccagctcac cctgtaaatc gtttctcaag tcattcaggc atactcacat cgcacaaaca 360

tatatatacc ccaagatttt gaatccatca atttgcagac gccataggcg tacaagttat 420

ccattcaagc gctccaaaaa tttgccaaga agtttgcctt aaatttggat tcatgaagtt 480

tgccaagaag tacgagaagt acatgaaggg gatggatgag gagctcccgg gcgtggggct 540

gaagcggctc aagaaattgc tcaagaaatg ccgctctgac ctccaatccc acgagaacga 600

cggctcctcc gccggccgct gccccggcca ttgctctgta tgtgatggga gttttttccc 660

atctcttctc aatgagatgt cagccgttat tggctgcttc aatgaaaagg ccaagaagct 720

tctcgagttg cacctggcat caggtttcaa gaaatataca atgtggttca ccagcaaggg 780

tcacaagagc catggggcat tgatacagca aggcaaagac ttggttactt atgcaattat 840

aaatgccgtg gccatgagga aaattttaaa gaaatatgac aagatacatt actcgaagca 900

agggcaggaa ttcaaagctc aagcccagag tctgcatatt gaaatacttc aatccccatg 960

gctctgtgag ctgatggctt tctacatgaa cttgagaaga agcaagaaga acaacggtgc 1020

tatggagctc tttggggatt gttctctcgt attcgatgat gacaaaccaa caatttcatg 1080

caacctcttt gactctatgc gtgtcgacat tagcttgaca tgttcgattt gcttggatac 1140

cgtgtttgat ccagttgctc tttcctgtgg tcacatatat tgctacttgt gcagctgttc 1200

tgctgcatcc gttacgatcg ttgatgggct gaagtctgcc gagcgcaaat caaagtgccc 1260

actgtgccga caggcaggag tctttcctaa tgctgtacac ttggatgagc tgaacatgct 1320

actaagctat agttgtccag agtactggga gaagagaata cagatggagc gggttgaacg 1380

tgttcgtctg gctaaggaac actgggagtc acagtgcagg gcattcttgg gcatgtgatt 1440

ctaaagttgg tggatttttt ttttctttag aggggcttca tatgtgatgt atagtttctt 1500

gacaaaatgg aatttgccat ttgttgtcac ttatatcctg ctctgttgct cctctttgtg 1560

taagaagttg gatttgtcat cctaaatgca aaaacagcag gggttgttca ctactgtgca 1620

cttagatgta aatagggtag atttgtagtc attgttcaag tgcataactg taaattcatt 1680

tatatttgat cagttc 1696

<210> 8

<211> 215

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 8

Met Lys Phe Ala Lys Lys Tyr Glu Lys Tyr Met Lys Gly Met Asp Glu
1 5 10 15

Glu Leu Pro Gly Val Gly Leu Lys Arg Leu Lys Lys Leu Leu Lys Lys
20 25 30

Cys Arg Ser Asp Leu Gln Ser His Glu Asn Asp Gly Ser Ser Ala Gly
35 40 45

Arg Cys Pro Gly His Cys Ser Val Cys Asp Gly Ser Phe Phe Pro Ser
50 55 60

Leu Leu Asn Glu Met Ser Ala Val Ile Gly Cys Phe Asn Glu Lys Ala
65 70 75 80

Lys Lys Leu Leu Glu Leu His Leu Ala Ser Gly Phe Lys Lys Tyr Thr
85 90 95

Met Trp Phe Thr Ser Lys Gly His Lys Ser His Gly Ala Leu Ile Gln
100 105 110

Gln Gly Lys Asp Leu Val Thr Tyr Ala Ile Ile Asn Ala Val Ala Met
115 120 125

Arg Lys Ile Leu Lys Lys Tyr Asp Lys Ile His Tyr Ser Lys Gln Gly
130 135 140

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

Ser Pro Trp Leu Cys Glu Leu Met Ala Phe Tyr Met Asn Leu Arg Arg
165 170 175

Ser Lys Lys Asn Asn Gly Ala Met Glu Leu Phe Gly Asp Cys Ser Leu
180 185 190

Val Phe Asp Asp Asp Lys Pro Thr Ile Ser Cys Asn Leu Phe Asp Ser
195 200 205

Met Arg Val Asp Ile Ser Leu
210 215

<210> 9

<211> 1533

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 9

tccgttgcgc tcgtctcctc ctctcgccgc gccgccgccc cccgccccca cgatcgacga 60

ctcgccgcgc cgccgccgcc gccgccgcca acgcatgcag gcaagatgaa gttcggtgca 120

atatatgaag agtatcttcg ggaacagcaa gacaaatacc taacaaagtg ctcacatgtg 180

gagtacaaac gtctcaaaaa ggtactgaag aaatgtcgag ttggtcgctc attgcaagaa 240

gactgcccca atggtgacca gcaggagggg aacaacgaat ctccagatat ttgcaaatgc 300

aattcatgca cattgtgtga tcaaatgttc tttacagaac ttactaagga ggcttcagaa 360

atagctggct gtttcagctc tagagtacaa cgtctcctaa atcttcatgt cccttcagga 420

tttctacgct atatttggcg tgtaaggcaa tgtttcatag atgatcaaca aatcatggtt 480

caagaaggca gaatgttact taattatgta accatgaatg ctatcgctat ccgtaaaatt 540

ctgaagaagt atgacaaaat acatggttct gtcagtggta gagatttcaa gagcaagatg 600

caaactgatc atattgaact gttgcagtcc ccttggctga tagaactggg tgctttccat 660

ctaaactgca atagttcaga tattgatgaa actgtggggt tccttaagaa tgagttcttc 720

aagaattttt cctgtgattt gaccgaagca cgaccactaa tgactatggc tatttctgaa 780

actatgaagt atgagtacag cctaacttgt ccaatttgct tggatacttt gttcaaccca 840

tatgcactta gctgtggcca tctcttttgc aaaggctgtg cttgtggagc tgcttctgtg 900

tacatctttc aaggtgttaa gtctgcacct cctgaggcga agtgtcctgt atgccgatcg 960

gatggtgtct ttgctcatgc tgtgcatatg actgaacttg acttgctcat caaaacaagg 1020

agcaaggatt actggagaca gagactgcga gaagagcgga atgagatggt taagcaatcc 1080

aaagaatact gggactctca ggctatgctg tcaatgggaa tttgactgag atctgaagtt 1140

acaatgatcg ccattcattg cttgcattgg tgtcaaacca aaaataatca ggtcgaccat 1200

aatctcaagc gtggagatca tccaagatga ttttaactta ttaactgcca gtctcctaaa 1260

agttgcaatc agtgaggact accttgggat agcacaggct aacacagctg aggttatttt 1320

attttagctc ttgaagaagc aattccattc cattattttt tgtcctaatg ttgtcgcctg 1380

atatagttta atttggaaat gcaaccatat ttaattaatt ttctttggac cttcaaatgt 1440

agtttggaac aatttatacg caatttatct gttctttgct ttgtaaaaac gagtgtagaa 1500

atgtcttatt tgaatgtctc tggctcgctg ctg 1533

<210> 10

<211> 339

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 10

Met Lys Phe Gly Ala Ile Tyr Glu Glu Tyr Leu Arg Glu Gln Gln Asp
1 5 10 15

Lys Tyr Leu Thr Lys Cys Ser His Val Glu Tyr Lys Arg Leu Lys Lys
20 25 30

Val Leu Lys Lys Cys Arg Val Gly Arg Ser Leu Gln Glu Asp Cys Pro
35 40 45

Asn Gly Asp Gln Gln Glu Gly Asn Asn Glu Ser Pro Asp Ile Cys Lys
50 55 60

Cys Asn Ser Cys Thr Leu Cys Asp Gln Met Phe Phe Thr Glu Leu Thr
65 70 75 80

Lys Glu Ala Ser Glu Ile Ala Gly Cys Phe Ser Ser Arg Val Gln Arg
85 90 95

Leu Leu Asn Leu His Val Pro Ser Gly Phe Leu Arg Tyr Ile Trp Arg
100 105 110

Val Arg Gln Cys Phe Ile Asp Asp Gln Gln Ile Met Val Gln Glu Gly
115 120 125

Arg Met Leu Leu Asn Tyr Val Thr Met Asn Ala Ile Ala Ile Arg Lys
130 135 140

Ile Leu Lys Lys Tyr Asp Lys Ile His Gly Ser Val Ser Gly Arg Asp
145 150 155 160

Phe Lys Ser Lys Met Gln Thr Asp His Ile Glu Leu Leu Gln Ser Pro
165 170 175

Trp Leu Ile Glu Leu Gly Ala Phe His Leu Asn Cys Asn Ser Ser Asp
180 185 190

Ile Asp Glu Thr Val Gly Phe Leu Lys Asn Glu Phe Phe Lys Asn Phe
195 200 205

Ser Cys Asp Leu Thr Glu Ala Arg Pro Leu Met Thr Met Ala Ile Ser
210 215 220

Glu Thr Met Lys Tyr Glu Tyr Ser Leu Thr Cys Pro Ile Cys Leu Asp
225 230 235 240

Thr Leu Phe Asn Pro Tyr Ala Leu Ser Cys Gly His Leu Phe Cys Lys
245 250 255

Gly Cys Ala Cys Gly Ala Ala Ser Val Tyr Ile Phe Gln Gly Val Lys
260 265 270

Ser Ala Pro Pro Glu Ala Lys Cys Pro Val Cys Arg Ser Asp Gly Val
275 280 285

Phe Ala His Ala Val His Met Thr Glu Leu Asp Leu Leu Ile Lys Thr
290 295 300

Arg Ser Lys Asp Tyr Trp Arg Gln Arg Leu Arg Glu Glu Arg Asn Glu
305 310 315 320

Met Val Lys Gln Ser Lys Glu Tyr Trp Asp Ser Gln Ala Met Leu Ser
325 330 335

Met Gly Ile

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 11

acaaccggtt tgagggctga atttgtttg 29

<210> 12

<211> 31

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 12

acagaattct atatcatatt ccagtgaagc t 31

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de modulação de uma característica em uma célula vegetal que compreende a modulação da expressão de um gene de ubiquitina E3 ligase similar a RING na célula vegetal.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a expressão do gene de ubiquitina E3 ligase similar a RING é modulada pela administração, à célula, de uma quantidade eficiente de um agente que pode modular os níveis de expressão de um gene de ubiquitina E3 ligase similar a RING na célula vegetal.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a característica é uma característica agronômica.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, em que a característica é uma que é afetada pelo metabolismo de nitrogênio, carbono e/ou enxofre, pela biossíntese de lipídeos, pela percepção de nutrientes, pela adaptação nutricional, pelo transporte de elétrons e/ou pela conservação de energia associada com a membrana.

5. Processo de acordo com a reivindicação 3, em que a característica é selecionada de um ou mais de utilização de nitrogênio, rendimento, crescimento celular, reprodução, fotossíntese, assimilação de nitrogênio, resistência a doenças, diferenciação, transdução de sinal, biossíntese de lignina, biossíntese de antocianina, regulação gênica, tolerância ao estresse abiótico e composição nutricional.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, em que a característica é a utilização de nitrogênio.

7. Processo de acordo com a reivindicação 5, em que a característica é o rendimento.

8. Processo de acordo com a reivindicação 5, em que a característica é a biossíntese de lignina.

9. Processo de acordo com a reivindicação 5, em que a característica é a biossíntese de antocianina.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-9, em que a célula vegetal é uma dicotiledônea, uma gimnosperma ou uma

monocotiledônea.

11. Processo de acordo com a reivindicação 10, em que a célula vegetal é uma dicotiledônea.

12. Processo de acordo com a reivindicação 10, em que a monocotiledônea é selecionada do grupo que consiste em milho, trigo, cevada, aveia, centeio, painço, sorgo, triticale, secale, *Triticum boeoticum*, espelta, Triticum dicoccum, *Eragrostis abyssinica*, sorgo, linho, grama, *Tripsacum sp.* e **teosite**.

13. Processo de acordo com a reivindicação 11, em que a dicotiledônea é selecionada do grupo que consiste em soja, tabaco ou algodão.

14. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-13, em que o agente aumenta os níveis de expressão de um gene de ubiquitina E3 ligase similar a RING na célula vegetal.

15. Processo de acordo com a reivindicação 14, em que a característica modulada é um aumento ou uma melhora em um ou mais de utilização de nitrogênio, rendimento, crescimento celular, reprodução, fotossíntese, assimilação de nitrogênio, biossíntese de antocianina, resistência a doenças, diferenciação, transdução de sinal, regulação gênica, tolerância a estresse abiótico e composição nutricional.

16. Processo de acordo com a reivindicação 14 ou 15, em que o agente que aumenta os níveis de expressão de um gene de ubiquitina E3 ligase similar a RING na célula vegetal compreende uma molécula de ácido nucléico que codifica uma ubiquitina E3 ligase similar a RING.

17. Processo de acordo com a reivindicação 16, em que a molécula de ácido nucléico compreende a sequência da SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 7, SEQ ID Nº: 9 ou um fragmento funcional da mesma.

18. Processo de acordo com a reivindicação 16, em que a molécula de ácido nucléico compreende uma sequência que se hibridiza sob condições de estringência média à sequência de nucleotídeos da SEQ ID Nº: 1 ou um fragmento funcional da mesma.

19. Processo de acordo com a reivindicação 16, em que a molécula de ácido nucléico compreende uma sequência de ácido nucléico deri-

vada da sequência de nucleotídeos da SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 7 ou SEQ ID Nº: 9 e possui uma sequência de nucleotídeos que compreende códons específicos para a expressão em plantas.

20. Processo de acordo com a reivindicação 16, em que a molécula de ácido nucléico codifica um polipeptídeo listado na SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 8 ou SEQ ID Nº: 10.

21. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-16, em que o agente que pode modular os níveis de expressão de um gene de ubiquitina E3 ligase similar a RING em uma célula vegetal compreende:

(a) uma sequência de nucleotídeos da SEQ ID Nº: 1 ou um fragmento ou um domínio da mesma;

(b) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo da SEQ ID Nº: 2, um fragmento ou um domínio da mesma;

(c) uma sequência de nucleotídeos que possui similaridade substancial a (a) ou (b);

(d) uma sequência de nucleotídeos capaz de se hibridizar com (a), (b) ou (c);

(e) uma sequência de nucleotídeos complementar a (a), (b), (c) ou (d); ou

(f) uma sequência de nucleotídeos que é o complemento inverso de (a), (b), (c) ou (d).

22. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-16, em que o agente que pode modular os níveis de expressão de um gene de ubiquitina E3 ligase similar a RING em uma célula vegetal compreende:

(a) uma sequência de polipeptídeo listada na SEQ ID Nº: 2 ou um fragmento funcional, um domínio, uma repetição ou uma quimera da mesma;

(b) uma sequência de polipeptídeo que possui similaridade substancial a (a),

(c) uma sequência de polipeptídeo codificada por uma sequência de nucleotídeos idêntica a ou que possui similaridade substancial a uma sequência de nucleotídeos listada na SEQ ID Nº: 1 ou um fragmento funcio-

nal ou um domínio da mesma ou uma sequência complementar à mesma; ou

(d) uma sequência de polipeptídeo codificada por uma sequência de nucleotídeos capaz de se hibridizar sob condições de estringência média a uma sequência de nucleotídeos listada na SEQ ID Nº: 1 ou a uma sequência complementar à mesma.

23. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 16-22, em que a sequência de ácido nucléico é expressa em uma localização ou um tecido específico da planta.

24. Processo de acordo com a reivindicação 23, em que a localização ou o tecido é selecionado de um ou mais de semente, epiderme, raiz, tecido vascular, meristema, câmbio, córtex, seiva, folha e flor.

25. Processo de acordo com a reivindicação 24, em que a localização ou o tecido é uma semente.

26. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 16-25, em que o agente que aumenta os níveis de expressão de um gene de ubiquitina E3 ligase similar a RING na célula vegetal compreende um cassete de expressão para a modulação de uma característica em uma célula vegetal que inclui uma sequência promotora ligada de forma operacional ao ácido nucléico isolado qc4 uma ubiquitina E3 ligase similar a RING.

27. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-13, em que o agente inibe ou diminui os níveis de expressão de um gene de ubiquitina E3 ligase similar a RING na célula vegetal.

28. Processo de acordo com a reivindicação 27, em que a característica modulada é um decréscimo em um ou mais de utilização de nitrogênio, rendimento, crescimento celular, reprodução, fotossíntese, assimilação de nitrogênio, biossíntese de antocianina, resistência a doenças, diferenciação, transdução de sinal, regulação gênica, tolerância a estresse abiótico e composição nutricional.

29. Processo de acordo com a reivindicação 27, em que a característica modulada é um aumento na biossíntese de lignina.

30. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações

27-29, em que o agente inibe a expressão da ubiquitina E3 ligase similar a RING mostrada na SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 7 ou SEQ ID Nº: 9.

31. Processo de acordo com a reivindicação 30 em que o agente é um oligonucleotídeo anti-senso ou uma molécula de RNA de filamento duplo.

32. Cassete de expressão que compreende uma sequência promotora ligada de forma operacional a uma molécula de ácido nucléico isolada de acordo com qualquer uma das SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7 ou 9 ou um fragmento ou uma variação das mesmas.

33. Vetor que compreende uma molécula de ácido nucléico de acordo com qualquer uma das SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7 ou 9 ou um fragmento ou uma variação das mesmas.

34. Célula vegetal transformada com um ácido nucléico de acordo com qualquer uma das SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7 ou 9 ou um fragmento ou uma variação das mesmas.

35. Processo de produção de uma planta transgênica que compreende:

(1) o fornecimento de um ácido nucléico isolado de acordo com qualquer uma das SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7 ou 9 ou um fragmento ou uma variação das mesmas; e

(2) a introdução do ácido nucléico na planta, em que o ácido nucléico é expresso na planta.

36. Processo de acordo com a reivindicação 35, em que o ácido nucléico é a SEQ ID Nº: 1 e a planta demonstra um aumento ou uma melhora em um ou mais de utilização de nitrogênio, rendimento, crescimento celular, reprodução, fotossíntese, assimilação de nitrogênio, resistência a doenças, diferenciação, biossíntese de antocianina, transdução de sinal, regulação gênica, tolerância a estresse abiótico e composição nutricional.

37. Processo da reivindicação 35 ou 36, em que o ácido nucléico é introduzido na planta utilizando o processo selecionado do grupo que consiste em bombardeio de micropartículas, transformação mediada por *Agro-*

bacterium e transformação mediada por "whiskers".

38. Planta produzida utilizando o processo como definido em qualquer uma das reivindicações 35-37.

39. Semente da planta como definido em reivindicação 38.

40. Célula vegetal como definido em planta da reivindicação 39.

41. Uso de uma molécula de ácido nucléico que compreende uma sequência de nucleotídeos de pelo menos 10 bases, cuja sequência é idêntica, complementar ou substancialmente similar a uma região de qualquer uma das SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 3, SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 7, SEQ ID Nº: 9 ou um fragmento funcional das mesmas em que o uso é selecionado do grupo que consiste em:

uso como um marcador cromossômico para identificar a localização do polinucleotídeo correspondente ou complementar em um cromossomo nativo ou artificial;

uso como um marcador para a análise de RFLP;

uso como um marcador para o cruzamento ligado à característica quantitativa;

(iii) uso como um marcador para o cruzamento auxiliado por marcadores;

(iv) uso como uma sequência de isca em um sistema de dois híbridos para identificar a sequência que codifica os polipeptídeos que interagem com o polipeptídeo codificado pela sequência de isca;

(v) uso como um indicador para diagnóstico para genotipar ou identificar um indivíduo ou uma população de indivíduos; e

(vi) uso para a análise genética para identificar os limites de genes ou éxons.

42. Uso de uma molécula de ácido nucléico que compreende uma sequência de nucleotídeos de pelo menos 10 bases, cuja sequência é idêntica, complementar ou substancialmente similar a uma região da SEQ ID Nº: 3 ou um fragmento funcional da mesma e em que o uso é selecionado do grupo que consiste em:

(i) uso como um marcador para a baixa capacidade de adapta-

ção à limitação de nitrogênio;

(ii) uso como um marcador para a maior síntese lignina; ou

(iii) uso como um marcador para baixo rendimento.

43. Anticorpo produzido contra um polipeptídeo isolado que compreende:

(a) uma sequência de polipeptídeo da SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 4, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 8 ou SEQ ID Nº: 10 ou um fragmento, um domínio, uma repetição ou uma quimera da mesma;

(b) uma sequência de polipeptídeo que possui similaridade substancial a (a);

(c) uma sequência de polipeptídeo codificada por uma sequência de nucleotídeos idêntica ou que possui similaridade substancial a uma sequência de nucleotídeos listada na SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 3, SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 7, SEQ ID Nº: 9 ou um fragmento ou um domínio da mesma ou uma sequência complementar à mesma;

(d) uma sequência de polipeptídeo codificada por uma sequência de nucleotídeos capaz de se hibridizar sob condições de estringência média a uma sequência de nucleotídeos listada na SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 3, SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 7 ou SEQ ID Nº: 9 ou uma sequência complementar à mesma; ou

(e) um fragmento funcional de (a), (b), (c) ou (d).

44. Anticorpo de acordo com a reivindicação 43 em que o polipeptídeo compreende a sequência da SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 4, SEQ 1D Nº: 6, SEQ ID Nº: 8 ou SEQ ID Nº: 10 ou uma variação da mesma que possui uma modificação de aminoácido conservativa.

45. Kit para ensaio imunológico que compreende o anticorpo como definido na reivindicação 43 ou 44, e instruções para o uso do mesmo.

46. Uso de uma molécula de ácido nucléico de acordo com qualquer uma das SEQ ID Nºs: 1, 3, 5, 7 ou 9 ou um fragmento ou uma variação das mesmas para modular um característica em uma célula vegetal.

47. Uso de acordo com a reivindicação 46, em que a característica é selecionada de um ou mais de utilização de nitrogênio, rendimento,

crescimento celular, reprodução, fotossíntese, assimilação de nitrogênio, resistência a doenças, diferenciação, transdução de sinal, biossíntese de lignina, biossíntese de antocianina, regulação gênica, tolerância a estresse abiótico e composição nutricional.

48. Uso de acordo com a reivindicação 47, em que a característica é a utilização de nitrogênio.

49. Uso de acordo com a reivindicação 47, em que a característica é a biossíntese de lignina.

50. Uso de acordo com a reivindicação 47, em que a característica é a biossíntese de antocianina.

51. Uso de acordo com a reivindicação 47, em que a característica é o rendimento.

52. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 46-51, em que a célula vegetal é uma dicotiledônea, uma gimnosperma ou uma monocotiledônea.

53. Uso de acordo com a reivindicação 52, em que a célula vegetal é uma dicotiledônea.

54. Uso de acordo com a reivindicação 52, em que a monocotiledônea é selecionada do grupo que consiste em milho, trigo, cevada, aveia, centeio, painço, sorgo, triticale, secale, *Triticum boeoticum*, espelta, Triticum dicoccum, *Eragrostis abyssinica*, sorgo, linho, grama, *Tripsacum sp.* e **teosite**.

55. Uso de acordo com a reivindicação 52 ou 53, em que a dicotiledônea é selecionada do grupo que consiste em soja, tabaco ou algodão.

56. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 46-55, em que o ácido nucléico é a SEQ ID Nº: 1 ou um fragmento da mesma e a característica modulada é um aumento ou uma melhora em um ou mais de utilização de nitrogênio, rendimento, crescimento celular, reprodução, fotossíntese, assimilação de nitrogênio, resistência a doenças, diferenciação, transdução de sinal, regulação gênica, biossíntese de antocianina, tolerância a estresse abiótico e composição nutricional.

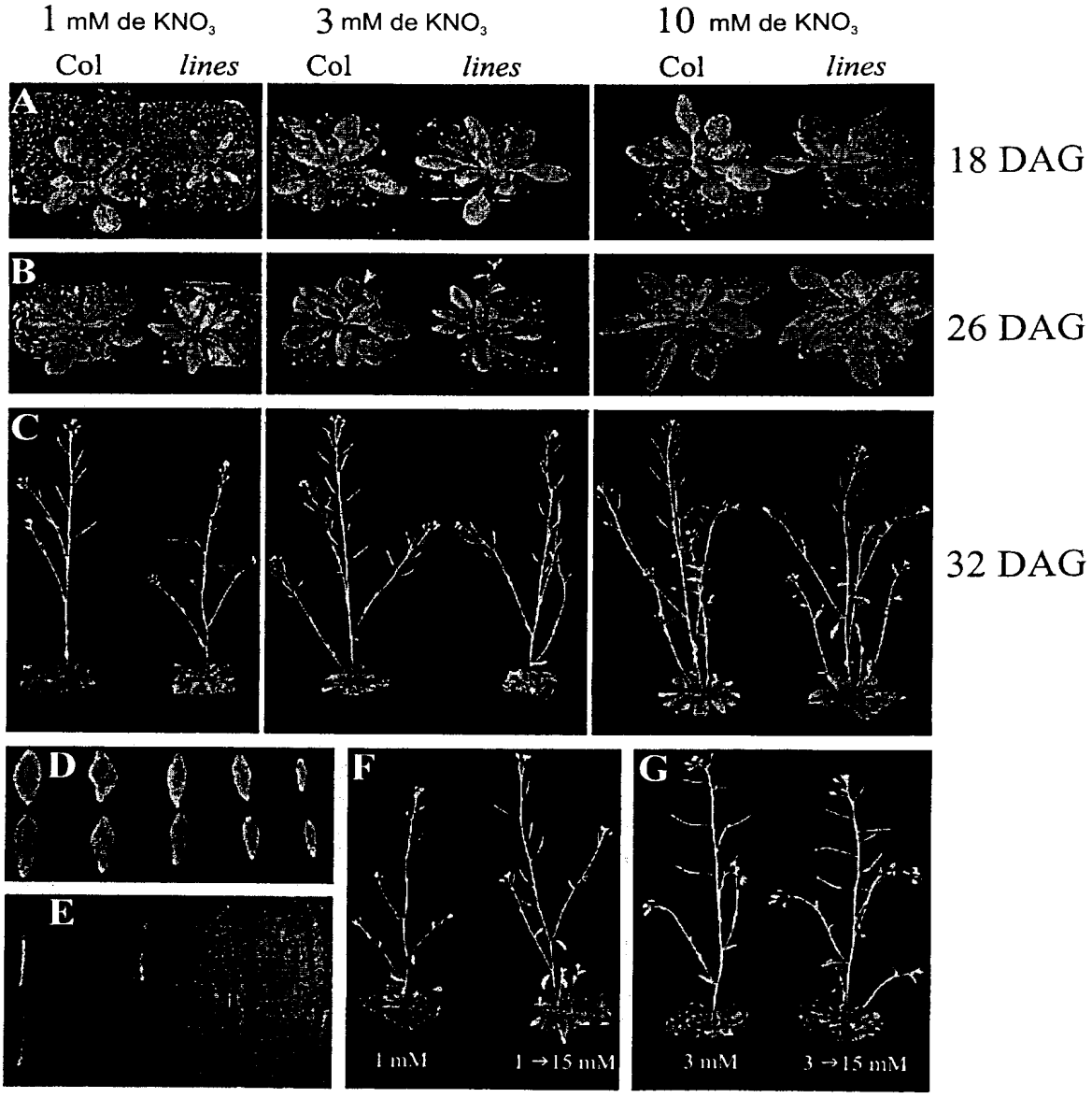

1 mM de KNO3
3 mM de KNO3
10 mM de KNO3
Col
lines
Col
lines
Col
lines
A
B
C
D
E
F
G
18 DAG
26 DAG
32 DAG
1 mM
1 →15 mM
3 mM
3 →15 mM

Fig.1

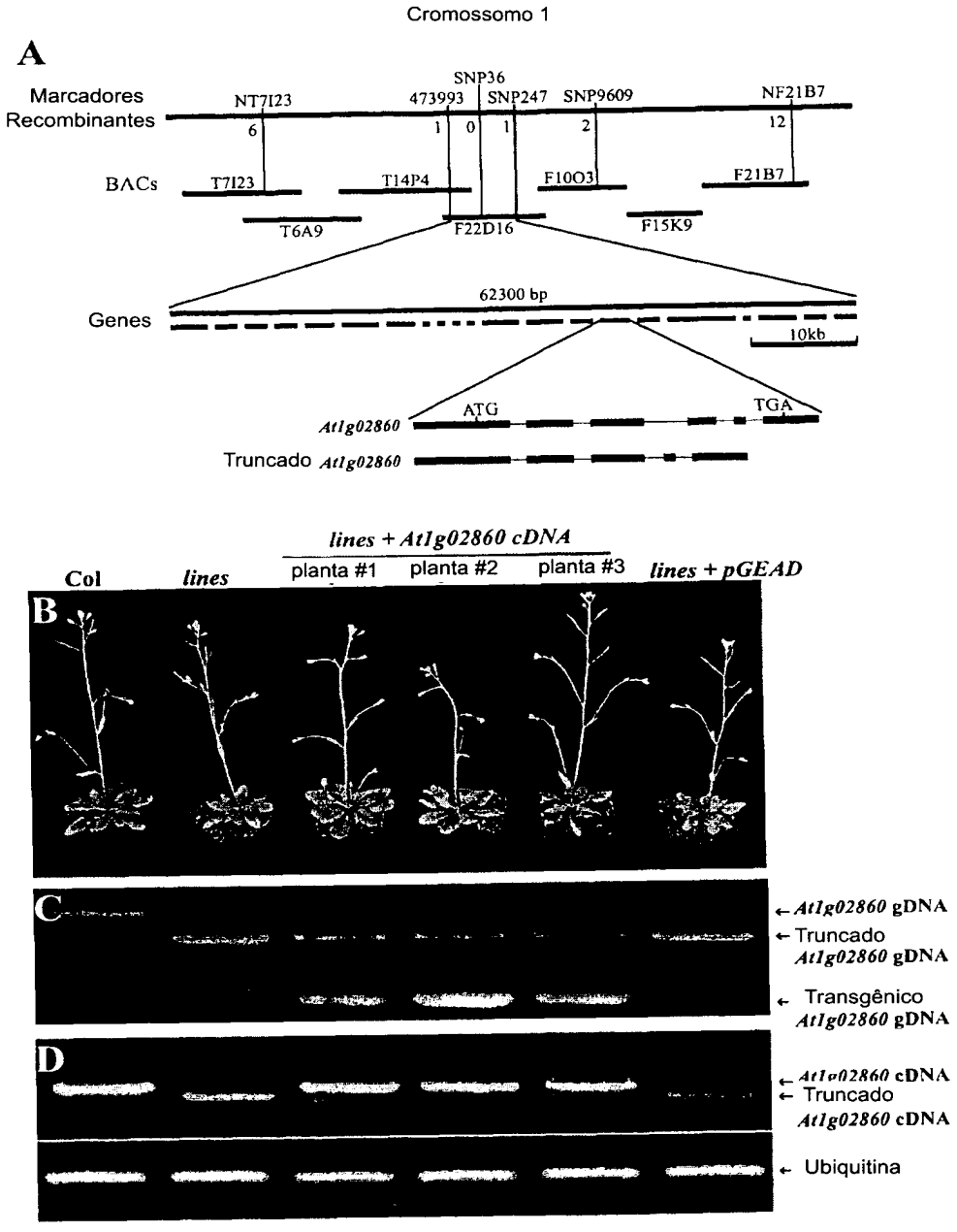
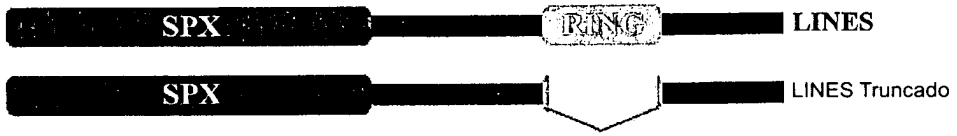

Cromossomo 1
A
Marcadores Recombinantes
NT7I23
SNP36
473993
SNP247
SNP9609
NF21B7
6
1
0
1
2
12
BACs
T7I23
T14P4
F10O3
F21B7
T6A9
F22D16
F15K9
62300 bp
Genes
10kb
ATG
TGA
At1g02860
Truncado At1g02860
lines + At1g02860 cDNA
Col
lines
planta #1
planta #2
planta #3
lines + pGEAD
B
C
← At1g02860 gDNA
← Truncado At1g02860 gDNA
← Transgênico At1g02860 gDNA
D
← At1g02860 cDNA
← Truncado At1g02860 cDNA
← Ubiquitina

Fig.2

A

```
1     MKFCKKYEEY MQGQKEKKNL PGVGFKKLKK ILKRCRRNHV PSRISFTDAI NHNCSRECPV
60    CDGTFFPELL KEMEDVVGWF NEHAQKLLEL HLASGFTKCL TWLRGNSRKK DHHGLIQEGK
121   DLVNYALINA VAIRKILKKY DKIHESRQGQ AFKTQVQKMR IEILQSPWLC ELMAFHINLK
181   ESKKESGATI TSPPPPVHAL FDGCALTFDD GKPLLSCELS DSVKVDIDLT CSICLDTVFD
241   PISLTCGHIY CYMCACSAAS VNVVDGLKTA EATEKCPLCR EDGVYKGAVH LDELNILLKR
301   SCRDYWEERR KTERAERLQQ AKEYWDYQCR SFTGI
```

B



C

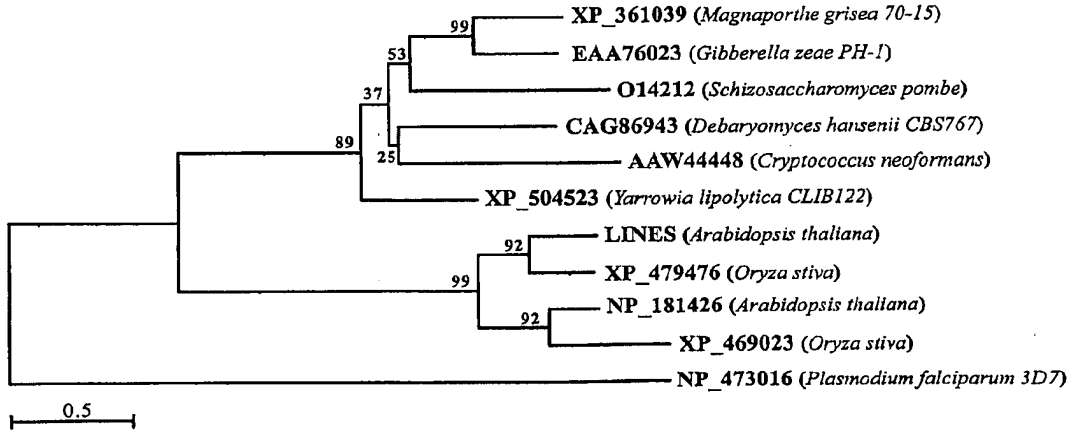


Fig.3

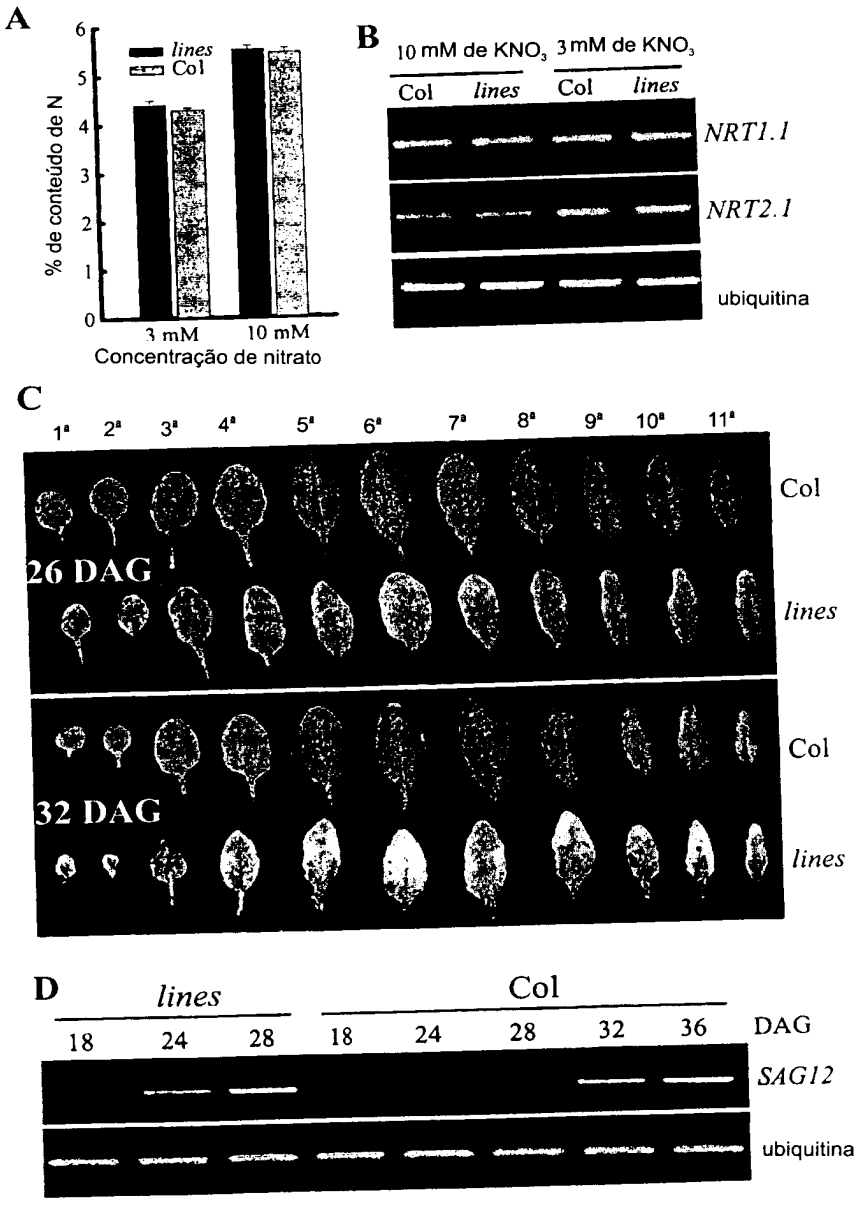

A
lines
Col
% de conteúdo de N
0
1
2
3
4
5
6
3 mM
10 mM
Concentração de nitrato
B
10 mM de KNO3
3 mM de KNO3
Col
lines
Col
lines
NRT1.1
NRT2.1
ubiquitina
C
1ª 2ª 3ª 4ª 5ª 6ª 7ª 8ª 9ª 10ª 11ª
26 DAG
Col
lines
32 DAG
Col
lines
D
lines
Col
18 24 28 18 24 28 32 36 DAG
SAG12
ubiquitina

Fig.4

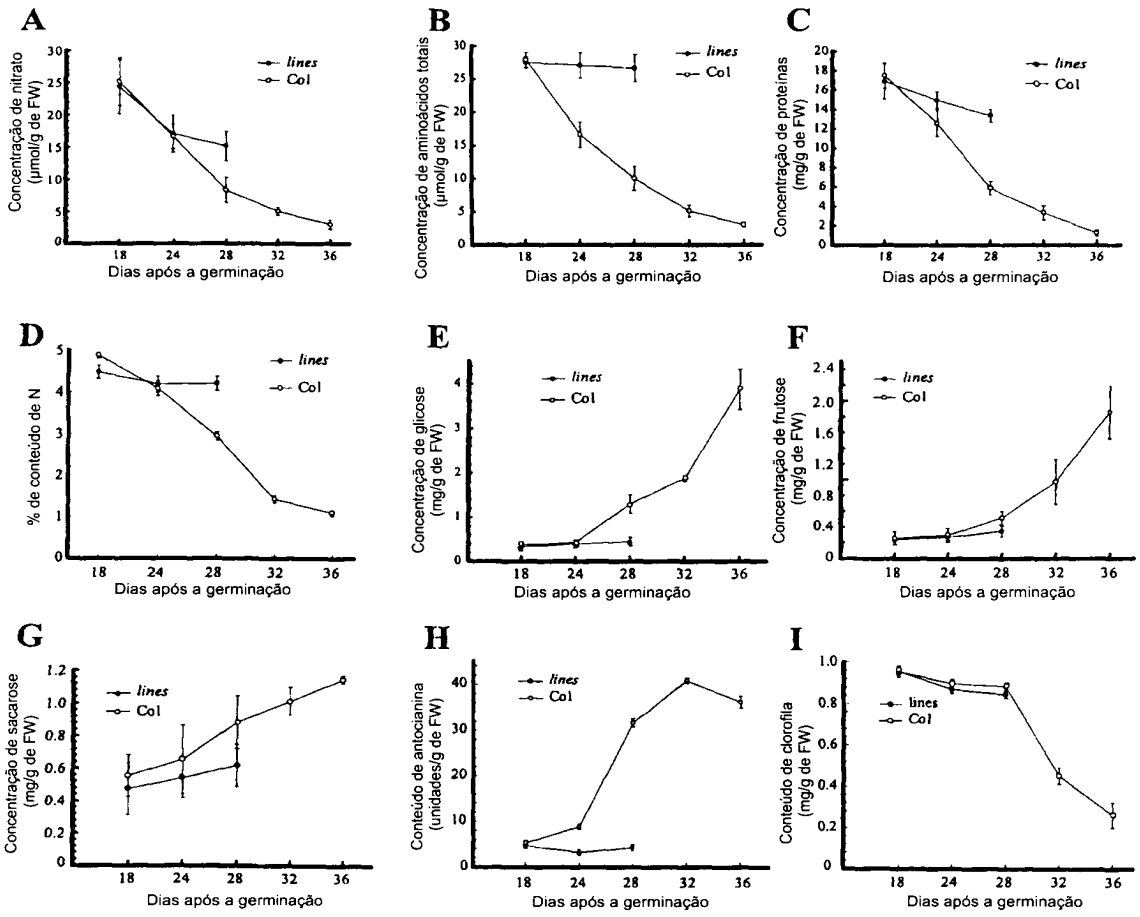

A
Concentração de nitrato (µmol/g de FW)
lines
Col
Dias após a germinação
B
Concentração de aminoácidos totais (µmol/g de FW)
lines
Col
Dias após a germinação
C
Concentração de proteínas (mg/g de FW)
lines
Col
Dias após a germinação
D
% de conteúdo de N
lines
Col
Dias após a germinação
E
Concentração de glicose (mg/g de FW)
lines
Col
Dias após a germinação
F
Concentração de frutose (mg/g de FW)
lines
Col
Dias após a germinação
G
Concentração de sacarose (mg/g de FW)
lines
Col
Dias após a germinação
H
Conteúdo de antocianina (unidades/g de FW)
lines
Col
Dias após a germinação
I
Conteúdo de clorofila (mg/g de FW)
lines
Col
Dias após a germinação

Fig.5

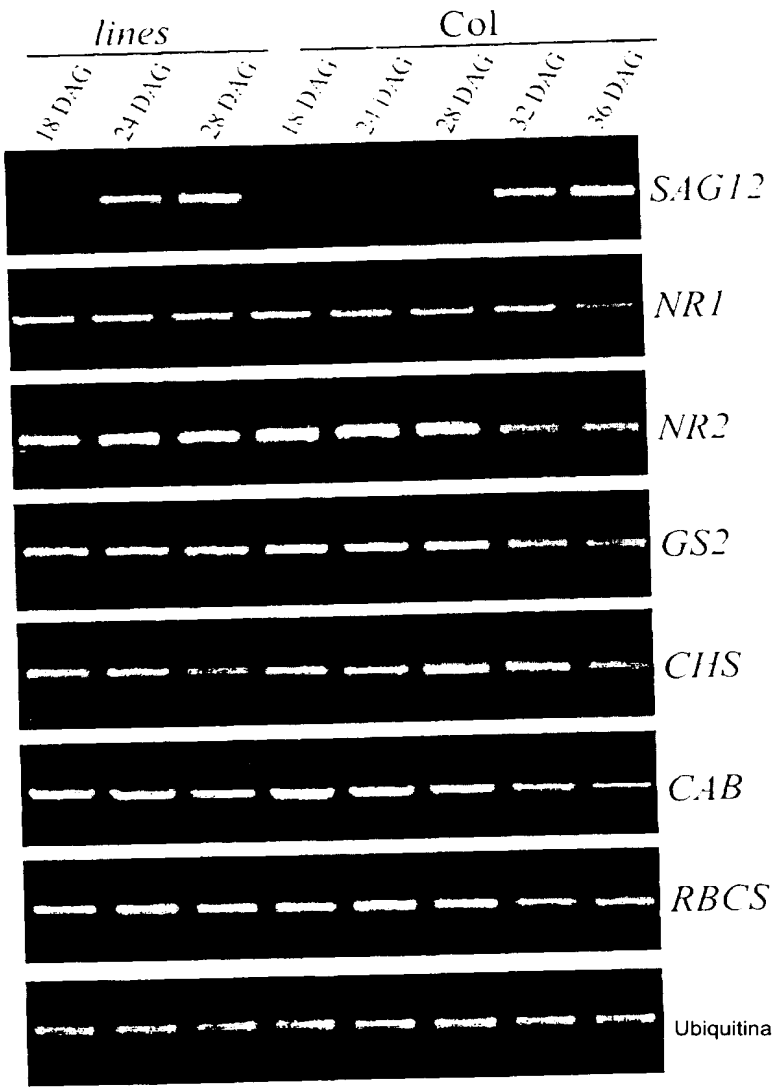

lines
Col
18 DAG
24 DAG
28 DAG
18 DAG
24 DAG
28 DAG
32 DAG
36 DAG
SAG12
NR1
NR2
GS2
CHS
CAB
RBCS
Ubiquitina

Fig.6

RESUMO

Patente de Invenção: **"GENE E PROTEÍNA PARA CAPACIDADE DE ADAPTAÇÃO À LIMITAÇÃO DE NITROGÊNIO E MODULAÇÃO DOS MESMOS".**

A presente invenção refere-se a um gene de ubiquitina E3 ligase similar a RING regulado pelo nitrogênio necessário para a sensibilidade a açúcares e à modulação da expressão deste gene para modular uma característica em uma planta. A ubiquitina E3 ligase similar a RING da presente invenção está envolvida na mediação das respostas adaptativas à limitação de nitrogênio em plantas e sua expressão é influenciada pela condição de nitrogênio. A expressão aumentada desta ou de genes substancialmente similares pode produzir plantas com melhor utilização de nitrogênio e maior rendimento.