

RESUMO

CÉLULAS DE PLANTAS E PLANTAS QUE SINTETIZAM UM AMIDO COM UMA MELHOR VISCOSIDADE FINAL

A presente invenção tem por objecto uma célula de planta que está geneticamente modificada, modificação genética essa que leva à redução da actividade de uma ou mais proteínas SSIII que ocorre endogenamente na célula da planta e ainda a redução da actividade de uma ou mais proteínas ERI que ocorre endogenamente na célula da planta e a redução da actividade de uma ou mais proteínas ERII que ocorre endogenamente na célula da planta, em comparação com as células das plantas correspondentes, de plantas de tipo selvagem, que não foram geneticamente modificadas. Outros aspectos da presente invenção têm por objecto plantas que contêm essas células de plantas, um processo para gerar as células das plantas e as plantas e o amido que se obtém delas.

DESCRIÇÃO

CÉLULAS DE PLANTAS E PLANTAS QUE SINTETIZAM UM AMIDO COM UMA MELHOR VISCOSIDADE FINAL

A presente invenção tem por objecto células de plantas e plantas que são geneticamente modificadas, levando essa modificação genética à redução da actividade de SSIII e das proteínas de ERI e ERII em comparação com as correspondentes células de plantas, de plantas de tipo selvagem, que não foram geneticamente modificadas. Além disso, a presente invenção tem por objecto meios e processos para a geração dessas células de plantas e dessas plantas. Essas células de plantas e essas plantas sintetizam um amido modificado, que é caracterizado pelo facto de ter um teor de amilose de pelo menos 30 % e um teor de fosfato que está aumentado em comparação com o amido das plantas de tipo selvagem correspondentes que não foram geneticamente modificadas e que têm uma viscosidade final numa análise de ARV que está aumentada em relação à técnica anterior e/ou tem uma distribuição de cadeias laterais modificadas e/ou tem uma tensão de gel aumentada no analisador de textura e/ou tem uma morfologia dos grânulos modificada e/ou tem uma dimensão média dos grânulos modificada. A presente invenção também tem assim por objecto o amido sintetizado pelas células de plantas e pelas plantas de acordo com a presente invenção e os processos para produzir este amido.

Tendo em vista a importância crescente que está hoje ligada aos constituintes das plantas como matérias-primas renováveis, uma das tarefas da investigação biotecnológica é tentar uma adaptação destas matérias-primas vegetais às necessidades da indústria transformadora. Para tornar possível a

utilização de matérias-primas renováveis em tantos campos de aplicação quanto possível, é ainda necessário chegar a muitas substâncias diversas.

O amido de polissacáridos é um polímero com unidades uniformes sob o ponto de vista químico, que são moléculas de glicose. Contudo, toma a forma de uma mistura altamente complexa de diferentes formas de moléculas que diferem no que respeita ao seu grau de polimerização e à ocorrência de ramificações das cadeias de glicose. Por isso, o amido não é uma matéria-prima uniforme. Pode fazer-se a distinção entre dois componentes diferentes sob o ponto de vista químico do amido, a amilose e a amilopectina. Em plantas normais utilizadas para a produção de amido como, por exemplo, milho, trigo ou batata, o amido da amilose é responsável por, aproximadamente, 20 % - 30 % e o amido da amilopectina por, aproximadamente, 70 % - 80 % do amido sintetizado. A amilose tem sido sempre considerada como um polímero linear consistindo em monómeros de α -D-glicose ligados por cadeias glicosídicas a α -1,4. Contudo, estudos mais recentes demonstraram a presença de pontos de ramificação α -1,6-glicosídicos (aproximadamente 0,1 %) (Hizukuri e Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10; Takeda et al., Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92).

Existem vários processos disponíveis para a determinação do teor de amilose. Alguns destes processos têm por base a capacidade de ligação da amilose ao iodo, que pode ser determinada potenciometricamente (Banks & Greenwood, em W. Banks & C. T. Greenwood, Starch and its components (pp. 51-66), Edinburgh, Edinburgh University Press), amperometricamente (Larson et al., Analytical Chemistry 25 (5), (1953), 802-804) ou espectrofotometricamente (Morrison & Laignelet, J. Cereal Sc. 1, (1983), 9-20). O teor de amilose pode também ser de-

terminado calorimetricamente, por meio de medições por CVD (calorimetria por varrimento diferencial) (Kugimiya & Donovan, Journal of Food Science 46, (1981), 765-770; Sievert & Holm, Starch/Starke 45 (4), (1993), 136-139). É ainda possível determinar o teor de amilose por via da utilização da cromatografia CED (cromatografia por exclusão de dimensão) do amido natural ou desramificado. Este processo tem sido recomendado em particular para a determinação do teor de amilose de amidos geneticamente modificados (Gerard et al., Carbohydrate Polymers 44, (2001), 19-27).

Ao contrário da amilose, a amilopectina exhibe um grau de ramificação maior e tem, aproximadamente, 4 % de pontos de ramificação demonstrados pela ocorrência de mais ligações α -1,6-glicosídicas. A amilopectina constitui uma mistura complexa de cadeias de glicose com diferentes modelos de ramificação. Uma outra diferença importante entre a amilose e a amilopectina é o seu peso molecular. Enquanto a amilose, consoante a origem do amido, tem um peso molecular de 5×10^5 - 10^6 Da, o peso molecular da amilopectina está entre 10^7 e 10^8 Da. As duas macromoléculas podem distinguir-se com base no seu peso molecular e nas suas diferentes propriedades físico-químicas e a forma mais simples de o visualizar é através das suas propriedades de ligação ao iodo.

Para além da relação amilose/amilopectina e o teor de fosfato, as propriedades funcionais do amido são altamente afectadas pelo peso molecular, o modelo de distribuição das cadeias laterais, o teor iónico, o teor de lípidos e de proteínas, a dimensão média dos grânulos e a morfologia dos grânulos e outras características similares. As propriedades funcionais importantes que podem ser mencionadas neste contexto são a solubilidade, o comportamento de retrogradação, a capacidade de se ligar à água, as propriedades de formação de

películas, a viscosidade, as propriedades de gelatinização, a estabilidade na congelação-descongelação, a estabilidade ácida, a tensão do gel e similares. A dimensão dos grânulos pode também ter importância para várias aplicações.

Os técnicos especializados frequentemente utilizam processos diferentes para determinar as propriedades de gelificação, uma das quais é a viscosidade final. Consoante o processo utilizado, os valores absolutos em particular, mas também os valores relativos podem diferir dentro de uma mesma amostra de amido. Um processo rápido e eficaz para analisar as propriedades de gelificação é a análise por ARV. Consoante a escolha dos parâmetros e o perfil da temperatura na análise por ARV, obtêm-se diferentes perfis de ARV para uma e a mesma amostra. Deve mencionar-se que nalguns casos utilizaram-se diferentes perfis utilizados na técnica anterior aqui mencionada a seguir quando se determinaram as propriedades de gelificação.

Uma visão global de diferentes espécies de plantas com uma redução das enzimas que participam na biossíntese do amido pode ser encontrada em Kossmann e Lloyd (2000, *Critical Reviews in Plant Sciences* 19 (3), 171-126). Até à data têm sido descritas plantas em que a actividade de uma proteína SSIII (Abel et al., 1996, *The Plant Journal* 10 (6), 9891-991; Lloyd et al., 1999, *Biochemical Journal* 338, 515-521) ou a actividade de uma proteína ERI (Kossmann et al., 1991, *Mol Gen Genet* 230, 39-44); Safford et al., 1998, *Carbohydrate Polymers* 35, 155-168), ou a actividade de uma proteína ERII (Jobling et al., 1999, *The Plant Journal* 18), ou a actividade de uma proteína ERI e de uma proteína ERII (Schwall et al., 2000, *Nature Biotechnology* 18, 551-554; patente de invenção internacional WO 96/34968), ou a actividade de uma proteína ERI e uma proteína SSIII (patente de invenção internacional

WO 00/08184), estão reduzidas. Nas plantas em que a actividade de uma proteína de SSIII está reduzida, observa-se uma ligeira alteração das cadeias laterais de amilopectina que passam de cadeias mais longas para cadeias mais curtas (Lloyd et al., 1999, Biochemical Journal 338,515-521), um teor de fosfato 70 % mais elevado, sem alterações no teor de amilose (Abel et al., 1996, The Plant Journal 10 (6), 9891-991) e uma viscosidade final reduzida na análise de ARV (Abel, 1995, PhD Tese na Freie Universität Berlin) em comparação com as plantas correspondentes de tipo selvagem. Nessas plantas, que estão descritas na patente de invenção internacional WO 00/08184, pode-se observar um aumento de 197 % no teor de fosfato, um aumento de 123 % no teor de amilose e uma viscosidade final determinada por análise de ARV que cai para 76 % da das plantas de tipo selvagem, tudo isto podendo ser observado no amido isolado em comparação com as plantas de tipo selvagem não transformadas. Além disso, a tensão do gel do amido em questão cai para 84 % em relação às plantas de tipo selvagem.

A análise por espectrofotometria pelo processo de Morrison & Laignelet (1983, J. Cereal Sc. 1,9-20) revela um teor de amilose no máximo de 89,14 % (correspondendo a 344 % das plantas de tipo selvagem) e um teor de fosfato no amido que corresponde até a um máximo de 522 % do teor de fosfato do amido isolado das correspondentes plantas de tipo selvagem, em plantas com uma actividade reduzida quer das proteínas ERI quer das ERII. A análise por ARV revelou um valor de viscosidade final destes amidos que estava aumentado até a um máximo de 237 %. Além disso, a morfologia dos grânulos modificados nos grãos de amido isolados dessas plantas distingue-se pelo facto dos grânulos terem grandes sulcos no centro do grânulo em questão, quando vistos ao microscópio sob luz polarizada.

Como resultado, um técnico especialista está familiarizado com células de plantas e plantas e amidos sintetizados por elas, que têm um teor de amilose e fosfato aumentado, mas cuja viscosidade final na análise por ARV está aumentada, mas não mais do que, no máximo de 256 % em comparação com as plantas de tipo selvagem, que não foram geneticamente modificadas. Viscosidades finais superiores na análise por ARV não foram encontradas até à data. Contudo, isto seria desejável dado que se teriam que utilizar menos amidos sólidos, por exemplo, utilizando um amido como espessante, agente de gelificação ou ligante, de modo de alcançar o efeito desejado. Isto permite, por exemplo, a redução da quantidade de aditivos em alimentos para seres humanos e animais, em produtos de cuidados de saúde e em cosméticos. Seria possível utilizar quantidades menores de amido quando se utilizavam esses amidos em colas, o que levaria à redução de custos, por exemplo, no fabrico do papel, no cartão e no cartão para isolamento. A presente invenção, tem por base um objectivo de providenciar células de plantas, plantas e amidos de células de plantas ou plantas apropriadas, com um teor de amilose aumentado e um teor de fosfato aumentado e, na análise por ARV, uma viscosidade final que está aumentada de, pelo menos 270 % e/ou uma tensão de gel aumentado do amido gelatinizado e/ou uma morfologia dos grânulos modificada.

Consegue-se este objectivo através dos enquadramentos especificados nas reivindicações da presente patente de invenção.

Um primeiro aspecto da presente invenção relaciona-se assim com uma célula de plantas que é geneticamente modificada, levando essa modificação genética à redução da actividade de uma ou mais proteínas SSIII ocorrendo endo-

genamente na célula da planta e à redução da actividade de uma ou mais proteínas ERI que ocorre endogenamente na célula das plantas e à redução da actividade de uma ou mais proteínas ERII que ocorre endogenamente nas células das plantas em comparação com as correspondentes células de plantas de tipo selvagem, que não foram geneticamente modificadas, enquanto as células de plantas modificadas geneticamente sintetizam um amido modificado que, após gelificação de um suspensão a 6 % em água, forma um gel com uma tensão de gel que estará aumentada de, pelo menos 300 % em comparação com a tensão de gel do amido extraído das células de plantas correspondentes de plantas de tipo selvagem que não foram geneticamente modificadas.

Neste contexto, a modificação genética pode ser qualquer modificação genética que leva a uma redução da actividade uma ou mais proteínas SSIII que ocorra endogenamente nas células das plantas e à redução da actividade de uma ou mais proteínas ERI que ocorra endogenamente nas células das plantas e à redução da actividade de uma ou mais proteínas de ERII que ocorra endogenamente na célula das plantas em comparação com as células das plantas correspondentes, de plantas de tipo selvagem, que não foram geneticamente modificadas.

Para os fins da presente invenção, a modificação genética pode englobar, por exemplo, a geração de células de plantas de acordo com a presente invenção submetendo um ou mais genes a mutagénese. O tipo de mutação é irrelevante, desde que leve a uma redução da actividade de uma proteína SSIII e/ou uma proteína ERI e/ou uma proteína ERII. Em relação com a presente invenção, o termo "mutagénese" entende-se como significando qualquer tipo de mutação, tal como, por exemplo, eliminações, mutações de pontos (subs-

tituições de nucleótidos), inserções, inversões, conversões de genes ou deslocação de cromossomas.

Neste contexto, a mutação pode ser gerada utilizando quaisquer agentes químicos ou uma radiação de elevada energia (por exemplo, raios X, radiação de neutrões, gama ou UV). Os agentes que podem ser utilizados para gerar mutações induzidas quimicamente e as mutações assim geradas pela acção dos muta genes em questão estão descritas, por exemplo, por Ehrenberg e Husain, 1981, (Mutation Research 86,1-113), Müller, 1972 (Biologisches Zentralblatt 91 (1), 31-48). A geração de mutantes de arroz utilizando raios gama, metano-sulfonato de etilo (MSE), N-metil-N-nitrosureia ou azida de sódio (NaN_3), estão descritas, por exemplo, em Jauhar e Siddiq (1999, Indian Journal of Genetics, 59 (1), 23-28), em Rao (1977, Cytologica 42,443-450), Gupta e Sharma (1990, Oryza 27,217-219) e Satoh e Omura (1981, Japanese Journal of Breeding 31 (3), 316-326). A geração de mutantes de trigo utilizando NaN_3 ou hidrazida maleica, está descrita em Arora et al., (1992, Anals of Biology 8 (1), 65-69). Uma visão geral sobre a geração de mutantes de trigo utilizando diferentes tipos de radiação de elevada energia e agentes químicos, está dada em Scarascia-Mugnozza et al., (1993, Mutation Breeding Review 10,1-28). Svec et al., (1998, Cereal Research Communications 26 (4), 391-396) que descreve a utilização de N-etil-N-nitrosureia para a geração de mutantes em triticales. A utilização de radiação MMS e gama para a geração de mutantes de painço está descrita em Shashidhara et al., (1990, Journal of Maharashtra Agricultural Universities 15 (1), 20-23). A geração de mutantes em espécies de plantas cuja propagação é predominantemente vegetativa foi descrita, por exemplo, para batatas que produzem um amido modificado (Hovenkamp-Hermelink et al., (1987, Theoretical and Applied Genetics 75,217-221) e para hortelã com um aumento da

qualidade do rendimento de óleo/qualidade do óleo modificado (Dwivedi et al., 2000, Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 22,460-463). Todos estes métodos são apropriados, em princípio, para a geração de células de plantas de acordo com a presente invenção e o amido produzido por elas.

As mutações em genes relevantes, em particular, em genes que codificam uma proteína ERI e/ou uma proteína ERII e/ou uma proteína SSIII, podem ser identificadas com a ajuda de processos conhecidos dos técnicos especialistas. As análises com base nas hibridações com sondas (Southern blot), a amplificação por meio da reação em cadeia de polimerase (RCP), a sequenciação das sequências genômicas em questão e a pesquisa de substituições individuais de nucleótidos, podem particularmente ser utilizadas. O processo de identificação das mutações com a ajuda de modelos de hibridação é, por exemplo, a pesquisa de polimorfismos com restrições no comprimento do fragmento (PRCF) (Nam et al., 1989, The Plant Cell 1,699- 705; Leister e Dean, 1993, The Plant Journal 4 (4), 745-750). Um exemplo de um processo com base na RCP é a análise de polimorfismos do comprimento do fragmento ampliados (PCFA) (Castiglioni et al., 1998, Genetics 149, 2039-2056; Meksem et al., 2001, Molecular Genetics and Genomics 265, 207-214; Meyer et al., 1998, Molecular and General Genetics 259,150-160). A utilização de fragmentos ampliados clivados com a ajuda de endonucleases de restrição (sequências polimórficas ampliadas, clivadas, SPAC) pode também ser utilizadas para amplificar mutações (Konieczny e Ausubel, 1993, The Plant Journal 4,403-410; Jarvis et al., 1994, Plant Molecular Biology 24, 685-687; Bachem et al., 1996, The Plant Journal 9 (5), 745-753). Os processos para a determinação de PNUs já foram descritos, *inter alia*, por Qi et al., (2001, Nucleic Acids Research 29 (22), e116) Drenkard

et al., (2000, Plant Physiology 124,1483-1492) e Cho et al., (1999, Nature Genetics 23, 203-207). Os processos que são particularmente apropriados são aqueles que permitem que um grande número de plantas seja analisado dentro de um curto espaço de tempo para avaliar as mutações em genes específicos. Esse processo, conhecido como TILLING (do inglês, targetting induced local lesions in genomes, (lesões locais induzidas no alvo em genomas)), já foi descrito por McCallum et al., (2000, Plant Physiology 123,439-442).

A utilização destes processos é apropriada em princípio para os fins da presente invenção.

Hoogkamp et al., (2000, Potato Research 43,179-189) isolaram mutantes estáveis de batatas, que continham um amido isento de amilose. Estas plantas já não sintetizavam enzimas activas para uma sintase de amido ligada aos grânulos (SALG I). Depois de se submeter estas plantas a outra mutagénesis, podem-se seleccionar as que adicionalmente têm mutações em genes que estão envolvidos na biossíntese do amido. As plantas que sintetizam o amido com melhores características podem então ser geradas. Utilizando o processo apropriado, é possível identificar e isolar células de plantas de acordo com a presente invenção, que produzem um amido de acordo com a presente invenção.

Além disso, as células de plantas de acordo com a presente invenção podem também ser geradas com a ajuda de transposições homólogos, isto é, transposições que estão presentes naturalmente nas células das plantas em questão. A seguir dá-se uma descrição detalhada deste processo.

Todos os processos mencionados antes são apropriados, em princípio, para gerar células de plantas de acordo com a

presente invenção e o amido modificado sintetizado por elas. A presente invenção, por isso, também tem por objecto processos para gerar células de plantas geneticamente modificadas que sintetizam um amido modificado, sendo este amido caracterizado pelo facto de ter um teor de amilose de, pelo menos 30 %, pelo facto de ter um teor de fosfato aumentado em comparação com o amido das células das plantas naturais correspondentes que não foram geneticamente modificadas e pelo facto de terem uma viscosidade aumentada na análise por ARV, em comparação com o amido das células das plantas naturais correspondentes, que não foram geneticamente modificadas.

Um outro aspecto da presente invenção diz respeito aos processos para gerar células de plantas que sintetizam um amido modificado, compreendendo a modificação genética da célula da planta, modificação genética essa que leva à redução de uma ou mais proteínas SSIII de ocorrência endógena na célula da planta e levam à redução da actividade de uma ou mais proteínas ERI que ocorrem endogenamente nas células das plantas e levam à redução da actividade de uma ou mais proteínas ERII que ocorrem endogenamente nas células das plantas, em comparação com as células das plantas correspondentes, de plantas naturais que não foram geneticamente modificadas.

Ainda um outro aspecto da presente invenção está relacionado com processos para gerar uma planta geneticamente modificada, que sintetiza um amido modificado, em que

- a) a célula da planta é gerada tal como se descreveu antes;

b) a planta é regenerada a partir de, ou utilizando a célula da planta gerada de acordo com a alínea a); e

c) se for o caso, ainda as plantas são geradas a partir de plantas geradas com a etapa da alínea b).

De acordo com a presente invenção, a expressão "geneticamente modificada" significa que a informação genética da célula da planta está alterada.

Neste contexto, uma redução da actividade de uma ou mais proteínas SSIII que ocorra endogenamente na célula da planta e uma redução da actividade de uma ou mais proteínas ERI que ocorra endogenamente na célula da planta e uma redução da actividade de uma ou mais proteínas ERII que ocorra endogenamente nas células das plantas são observadas nas células das plantas de acordo com a presente invenção, em comparação com as células de plantas correspondentes, de plantas naturais que não foram modificadas geneticamente.

As modificações genéticas para gerar células de plantas de acordo com a presente invenção podem ser realizadas simultaneamente ou em etapas consecutivas. Neste contexto, cada modificação genética pode levar à redução da actividade de uma ou mais proteínas SSIII e/ou uma ou mais proteínas ERI e/ou uma ou mais proteínas ERII. O material inicial pode ser quer plantas naturais ou células de plantas naturais em que não houve nenhuma modificação genética prévia, de modo a reduzir a actividade de uma ou mais proteínas SSIII e/ou uma ou mais proteínas ERI e/ou uma ou mais proteínas ERII ou ainda células de plantas geneticamente modificadas ou plantas geneticamente modificadas, em que a actividade de uma ou mais proteínas SSIII e/ou uma ou mais proteínas ERI e/ou uma ou mais proteínas ERII já sofreram modificações genéticas. Essas

plantas (células de plantas) modificadas geneticamente constituem o material inicial e as modificações genéticas que se realizam em seguida, preferencialmente, dizem apenas respeito à actividade, em cada caso, de uma ou mais proteínas cuja actividade não tenha ainda sido reduzida (SSIII, ERI ou ERII).

Por exemplo, a redução da expressão de um ou mais genes SSIII que ocorrem endogenamente na célula da planta e uma redução da expressão de um ou mais genes de ERII que ocorrem endogenamente na célula de plantas e/ou uma redução da actividade, em cada caso, de uma ou mais das proteínas mencionadas antes que ocorrem nas células de plantas, e que são observadas nas células de plantas geneticamente modificadas de acordo com a presente invenção, em comparação com células de plantas, de plantas naturais que não tenham sido geneticamente modificadas.

Para os fins da presente invenção, a expressão "redução da actividade" refere-se a uma redução da expressão de genes endógenos que codificam as proteínas SSIII, ERI e/ou ERII e/ou uma redução da quantidade das proteínas SSIII, ERI e/ou ERII nas células e/ou uma redução da actividade enzimática das proteínas SSIII, ERI e/ou ERII nas células.

A redução da expressão pode ser determinada, por exemplo, medindo a quantidade de transcriptos que codificam as proteínas SSIII, ERI ou ERII, por exemplo, por análise de "Northern blot" ou TA-RCP. Uma redução preferencialmente significa, neste contexto, uma redução da quantidade de transcriptos de, pelo menos 50 %, em particular, pelo menos 70 %, preferencialmente, pelo menos 85 % e, mais preferencialmente, pelo menos 95 % em comparação com as células correspondentes que não foram modificadas geneticamente. A

redução da quantidade das proteínas SSIII, ERI e/ou ERII que resulta numa actividade reduzida destas proteínas nas células das plantas em questão, pode ser determinada, por exemplo, por processos imunológicos, tais como, análise de Western blot, ELISA (ensaio imuno-absorvente ligado a enzimas) ou RIA (ensaio rádio-imune). Neste contexto, uma redução significa, preferencialmente, uma redução da quantidade das proteínas SSIII, ERI e/ou ERII de pelo menos 50 %, em particular, pelo menos 70 %, preferencialmente, pelo menos 85 % e, mais preferencialmente, pelo menos 95 % em comparação com as células correspondentes que não foram modificadas geneticamente.

Em ligação com a presente invenção, a proteína SSIII é entendida como significando uma classe de amido-sintase solúvel (AGP-glicose-1,4-alfa-D-glucan-4-alfa-D-glicosil-transferase; EC 2.4.1.21). As amido-sintases solúveis catalisam uma reacção de glicosilação, em que os resíduos de glicose do substrato AGP-glicose são transferidas para as cadeias alfa-1,4 ligadas a glucano, com a formação de uma ligação alfa-1,4 (AGP-glicose + {(1,4)-alfa-D-glicosil}(N) $\Rightarrow$ AGP + {(1,4)-alfa-D-glicosil}(N+1)).

As proteínas SSIII estão descritas, por exemplo, por Marshal et al., (The Plant Cell 8; (1996); 1121-1135), Li et al., (2000, Plant Physiology 123,613-624), Abel et al., (The Plant Journal 10 (6); (1996); 981-991) e na patente de invenção internacional WO 0066745. A estrutura das proteínas SSIII mostra frequentemente uma sequência de domínios. Na terminação n, as proteínas SSIII têm um péptido de sinal para o transporte, para plastídios. Em direcção à terminação C, é seguida por uma região de terminal N, uma região específica de SSIII e um domínio catalítico (Li et al., 2000, Plant Physiology 123, 613-624). Outras análises que se baseiam nos

alinhamentos das sequências primárias (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>), revelaram que a proteína SSIII da batata tem o que é conhecido como um domínio de ligação de hidratos de carbono (DLC). Este domínio (Pfam elemento cbm 25) compreende os aminoácidos 377 até 437 da sequência da proteína SSIII da batata mostrada na SEQ ID N°. 2. Relacionada com a presente invenção, deve entender-se que uma proteína SSIII significa amido-sintases, que têm, pelo menos 50 %, preferencialmente, pelo menos 60 %, de uma maneira especialmente preferida, pelo menos 70 %, mais preferencialmente, pelo menos 80 % e, em particular, pelo menos 90 % de identidade com a sequência mostrada na SEQ ID N°. 3.

O termo homologia ou identidade, entende-se como significando o número de aminoácidos agregados (identidade) com outras proteínas, expresso em percentagem. Esta identidade é determinada, preferencialmente, comparando a SEQ ID N°. 3 com outras proteínas com a ajuda de programas de computador. Se as sequências que se comparam umas com as outras têm um comprimento diferente, deve determinar-se a identidade de tal maneira que o número de aminoácidos que a sequência pequena partilha com a sequência maior, determina a percentagem de identidade. A identidade pode ser determinada por processos de rotina por meio de programas de computador conhecidos que estão publicamente disponíveis, tais como, por exemplo, ClustalW (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22 (1994), 4673-4680). O ClustalW está disponível publicamente na Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg. DE) e na Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg. DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Alemanha. O ClustalW pode do mesmo modo ser baixado de várias páginas da internet, *inter alia*, a do IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B. P. 163, 67404 Illkirch Cedex, França; <ftp://ftp-igbmc.u->

strasbg.fr/pub/) e a do EBI (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/) e todas as páginas da internet que espelham a da EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK). Se se utilizar o programa de computador ClustalW na versão 1.8 para determinar a identidade, por exemplo, entre a proteína de referência do presente pedido de patente e outras proteínas, estabelecem-se os seguintes parâmetros: KTUPLE = 1, TOPDIAG = 5, WINDOW = 5, PAIRGAP = 3, GAPOPEN = 10, GAPEXTEND = 0,05, GAPDIST = 8, MAXDIV = 40, MATRIX = GONNET, ENDGAPS (OFF), NOPGAP, NOHGAP. Uma possibilidade de encontrar sequências semelhantes, é fazendo pesquisas em bases de dados de sequências. Aqui faz-se entrar uma ou mais sequências que são conhecidas como as sequências de pesquisa (query). Esta sequência de pesquisa é então comparada com as sequências presentes nas bases de dados seleccionadas utilizando programas de computador de estatística. Se, por exemplo, essa pesquisa da base de dados é realizada no NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), os parâmetros padrão para a respectiva pesquisa de comparação devem ser utilizados. Para comparações de sequências de proteínas (blast), estes parâmetros são: limite de entrada = não activado; filtro = baixa complexidade activada; valor esperado = 10; dimensão da palavra = 3; matriz = BLOSUM62; custos de intervalo: existência = 11, extensão = 1. O resultado desta pesquisa é, entre outros parâmetros, o grau de identidade entre a sequência de pesquisa e as sequências semelhantes encontradas nas bases de dados. Assim, uma proteína SSIII deve entender-se como significando, em relação com a presente invenção, amido-sintases que, quando utilizam, pelo menos um dos processos descritos antes para a determinação da identidade com a sequência mostrada na SEQ ID N°. 3 têm, pelo menos 50 %, preferencialmente, pelo menos 60

%, especialmente preferida, pelo menos 70 %, mais preferencialmente, pelo menos 80 % e, em particular, pelo menos 90 % de identidade.

Para os fins da presente invenção, o termo gene de SSIII é entendido como significando moléculas de ácidos nucleicos (ADN, ADNC, ARN), que codificam uma proteína SSIII, preferencialmente, da batata. As moléculas de ácidos nucleicos que codificam uma proteína SSIII já foram descritas para uma variedade de espécies de plantas, tais como, por exemplo, batata (Abel et al., The Plant Journal 10 (6); (1996); 981-991), trigo (patente de invenção internacional WO 00/66745, Li et al., 2000, Plant Physiology 123, 613-624; Genbank Acc. N°. AF258608; Genbank Acc. N°. AF258609), milho (Gao et al., 1998, Plant Cell 10 (3), 399-412; Genbank Acc. N°. AF023159), Vigna (Genbank Acc. N°. AJ225088), arroz (Genbank Acc. N°. AY100469; Genbank Acc. N°. AF43291) e Arabidopsis (Genbank Acc. N°. AC007296).

Para os fins da presente invenção, a expressão "enzima de ramificação" ou "proteína da ER" (α -1,4-glucano: α -1,4-glucan-6-glicosiltransferase, E. C. 2.4.1.18) é entendida como significando uma proteína que catalisa uma reacção de transglicosilação na qual as ligações α -1,4 de um dador de α -1,4-glucano são hidrolisadas e as cadeias de α -1,4-glucano que são libertadas neste processo são transferidas para uma cadeia de um receptor de α -1,4-glucano, onde são convertidas em ligações α -1,6.

O termo "proteína ERI" deve entender-se como significando, para os fins da presente invenção uma isoforma I da enzima de ramificação (enzima de ramificação = ER). A proteína ERI deriva preferencialmente de plantas da batata. Neste contexto, a terminologia isoforma basea-se numa nomenclatura

proposta por Smith-White e Preiss (Smith-White e Preiss, Plant Mol Biol. Rep. 12, (1994), 67-71, Larsson et al., Plant Mol Biol. 37, (1998), 505-511). Esta nomenclatura assume que todas as enzimas que têm um grau de homologia (identidade) superior ao nível dos aminoácidos em relação à proteína ERI do milho (GenBank Acc. N°. D11081; Baba et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 181 (1), (1991), 87-94; Kim et al., Gene 216, (1998), 233-243) do que a proteína ERII do milho (Genbank Acc. N°. AF072725, U65948), são referidas como enzimas de ramificação da isoforma I, abreviadas para proteínas ERI.

A expressão "proteína ERII" deve entender-se como significando, para os fins da presente invenção, uma isoforma II da enzima de ramificação (enzima de ramificação = ER). Esta enzima tem origem, preferencialmente, nas plantas da batata. Em ligação com a presente invenção, todas as enzimas que ao nível dos aminoácidos têm um grau de homologia (identidade) superior ao da proteína ERII do milho (Genbank Acc. N°. AF072725, U65948) do que a proteína ERI do milho (Genbank Acc. N°. D11081, AF072724) devem ser referidas como proteínas ERII.

A expressão "gene da ERI" deve entender-se como significando para os fins da presente invenção, uma molécula de ácido nucleico (ADNc, ADN), que codifica uma "proteína de ERI", preferencialmente, uma proteína de ERI de plantas de batata. Essas moléculas de ácidos nucleicos têm sido descritas para um grande número de plantas, por exemplo, para o milho (Genbank Acc. N°. D11081, AF072724), o arroz (Genbank Acc. N°. D11082), as ervilhas (Genbank Acc. N°. X80010) e a batata. Têm sido descritas várias formas do gene de ERI ou da proteína ERI, da batata, por exemplo, por Khoshnoodi et al., Eur. J. Biochem. 242 (1), 148-155 (1996), Genbank Acc. N°.

Y08786 e por Kossmann et al., Mol. Gen. Genet. 230, (1991), 39-44). Nas plantas da batata, o gene de ERI é expresso predominantemente em tubérculos e num grau muito menor nas folhas (Larsson et al., Plant Mol. Biol. 37, (1998), 505-511).

A expressão "gene de ERII" deve entender-se como significando, para os fins da presente invenção, uma molécula de ácido nucleico (por exemplo, ADNc, ADN), que codifica uma proteína de ERII, preferencialmente, uma proteína de ERII de plantas da batata. Essas moléculas de ácidos nucleicos já foram descritas para um grande número de plantas, por exemplo, para a batata (GenBank Acc. N°. AJ000004, AJ011888, AJ011889, AJ011885, AJ011890, EMBL GenBank A58164), o milho (AF072725, U65948), a cevada (AF064561), o arroz (D16201) e o trigo (AF286319). Nas plantas da batata, o gene de ERII é expresso predominantemente nos tubérculos e em muito menor grau nas folhas (Larsson et al., Plant Mol. Biol. 37, (1998), 505-511).

O termo "transgénico" deve entender-se como significando, no presente contexto, que a informação genética das células das plantas de acordo com a presente invenção se desviam das células de plantas correspondentes que não foram geneticamente modificadas sofrendo a introdução de uma molécula de ácido nucleico estranha ou de várias moléculas de ácidos nucleicos estranhas na sua célula.

Noutro enquadramento da presente invenção, a modificação genéticas das células das plantas transgénicas de acordo com a presente invenção, consiste na introdução de uma ou mais moléculas estranhas de ácidos nucleicos cuja presença e/ou a expressão leva à redução da actividade das proteínas SSIII e ERI e ERIII em comparação com as células das plantas corres-

pondentes, de plantas naturais, que não foram modificadas geneticamente. Especificamente, a expressão "manipulação genética" é entendida como significando a introdução de moléculas de ácidos nucleicos homólogas e/ou heterólogas e/ou moléculas de ácidos nucleicos estranhas, que tenham sido submetidas a mutagénese numa célula de plantas, em que a referida introdução destas moléculas leva à redução da actividade de uma proteína SSIII e/ou uma proteína ERI e/ou uma proteína ERII.

A expressão "molécula de ácido nucleico estranha" ou de "moléculas de ácidos nucleicos estranhas" deve entender-se como significando, para os fins da presente invenção, uma molécula tal que ou não ocorre naturalmente nas células das plantas em questão ou que não ocorre naturalmente nas células das plantas, num arranjo espacial específico ou que está localizada num sítio no genoma das células das plantas onde não ocorre naturalmente. A molécula de ácido nucleico estranha é, preferencialmente, uma molécula recombinante, que consiste em vários elementos cuja combinação ou arranjo espacial específico não ocorre naturalmente nas células das plantas. As moléculas de ácidos nucleicos estranhas que são utilizadas para a modificação genética, podem tomar a forma de uma estrutura híbrida de ácido nucleico ou de várias estruturas de ácidos nucleicos separadas; em particular, naquilo que é conhecido como uma estrutura única, dupla e tripla. Assim, a molécula de ácido nucleico estranha pode ser, por exemplo, o que é conhecido como uma "estrutura tripla", que se deve entender como significando um único vector para a transformação da planta, que contém não apenas a informação genética para a inibição da expressão de um ou mais genes endógenos de SSIII, mas também a informação genética para a inibição da expressão de um ou mais genes de ERI e de um ou mais genes de ERII ou cuja presença ou

expressão leva à redução da actividade de uma ou mais proteínas de SSIII, ERI e ERII.

Num outro enquadramento, a molécula de ácido nucleico estranha pode ser o que é conhecido como uma "estrutura dupla", que se pode entender como significando um vector para a transformação da planta, que contém a informação genética para a inibição da expressão de dois dos três genes alvo (genes de SSIII, ERI, ERII) ou cuja presença ou expressão leva à redução da actividade de duas das três proteínas alvo (proteínas de SSIII, ERI, ERII). A inibição da expressão do terceiro gene alvo e/ou a redução da actividade da terceira proteína alvo é efectuada, neste enquadramento da presente invenção, com ajuda de uma molécula de ácido nucleico estranha, separada, que contém a informação genética relevante para a inibição deste terceiro gene alvo.

Num outro enquadramento da presente invenção, não é uma estrutura tripla que é introduzida no genoma da célula da planta, mas várias moléculas estranhas de ácidos nucleicos diferentes, que são introduzidas, sendo uma destas moléculas de ácidos nucleicos estranhas, por exemplo, uma molécula de ADN que constitui, por exemplo, uma estrutura de co-supressão que implica uma redução da expressão de um ou mais genes endógenos de SSIII e uma molécula de ácido nucleico estranha, que pode ser de ADN, que codifica, por exemplo, um ARN anti-paralelo, que provoca a redução da expressão de um ou mais genes endógenos de ERI e/ou ERII. Quando se estruturam as moléculas de ácidos nucleicos estranhas, contudo, a utilização de qualquer combinação de estruturas anti-paralelas, de co-supressão, de ribozima e de ARN de hélice dupla ou uma mutagénese *in vivo*, que leva à redução simultânea da expressão de genes dos genes endógenos que codificam uma ou mais das proteínas SSIII, ERI e ERII ou que levam a uma

redução simultânea da actividade de uma ou mais das proteínas SSIII, ERI e ERII, também é aceitável em princípio. As moléculas de ácidos nucleicos estranhas podem ser introduzidas no genoma da célula da planta, quer simultaneamente ("co-transformação") ou uma atrás da outra, isto é, em sucessão em momentos diferentes ("super-transformação").

As moléculas de ácidos nucleicos estranhas podem também ser introduzidas em diferentes plantas individuais de uma espécie. Isto pode dar origem nas plantas em que a actividade de uma proteína ou de duas proteínas alvo (ERI, ERII, SSIII) fica reduzida. A subsequente hibridação pode então dar origem a plantas, nas quais a actividade de todas as proteínas alvo está reduzida.

Em vez de uma célula de planta ou de uma planta natural, pode-se utilizar ainda um mutante que se distingue por ter já exibido uma actividade reduzida de uma ou mais das proteínas alvo (ERI, ERII, SSIII), para a introdução de uma molécula estranha de ácido nucleico ou para a geração de células de plantas ou plantas de acordo com a presente invenção. Os mutantes podem ter a forma de mutantes de ocorrência espontânea ou ainda de mutantes que tenham sido gerados pela aplicação específica de mutagénese. As possibilidades para gerar esses mutantes já foram descritas antes.

As células de plantas de acordo com a presente invenção e o seu amido pode ser gerados ou produzidos utilizando o que é conhecido como mutagénese de inserção (artigo de revisão: Thorneycroft et al., 2001, Journal of experimental Botany 52 (361), 1593-1601). A mutagénese de inserção deve ser entendida como significando, em particular, a inserção de transposições ou o que é conhecido como um ADN de transferência (ADN-T) num gene que codifica uma proteína ERI e/ou uma proteína

ERII e/ou uma proteína SSIII, reduzindo assim a actividade das referidas proteínas na célula em questão.

Os transposões podem ter a forma de transposões que ocorrem naturalmente na célula (transposões endógenos) ou ainda os que não ocorrem naturalmente na referida célula, mas que tenham sido introduzidos na célula por meio de processos recombinantes, tais como, por exemplo, por transformação da célula (transposões heterólogos). A modificação da expressão dos genes por meio de transposões é conhecida dos especialistas da matéria. Uma revisão da utilização dos transposões endógenos e heterólogos como ferramentas na biotecnologia das plantas pode ser encontrada em Ramachandran e Sundaresan (2001, *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 234-252). A possibilidade de identificar mutantes em que os genes específicos tenham sido inactivados pela mutagénese de inserção de transposões, pode ser encontrada numa revisão feita por Maes et al., (1999, *Trends in Plant Science* 4 (3), 90-96). A geração de mutantes de arroz com a ajuda de transposões endógenos está descrita por Hirochika (2001, *Current Opinion in Plant Biology* 4, 118-122). A identificação de genes de milho com ajuda de retrotransposões endógenos está indicada, por exemplo, em Hanley et al., (2000, *The Plant Journal* 22 (4), 557-566). A possibilidade de gerar mutantes com a ajuda de retrotransposões e processos para a identificação de mutantes está descrita por Kumar e Hirochika (2001, *Trends in Plant Science* 6 (3), 127-134). A actividade dos transposões heterólogos, nas diferentes espécies, tem sido descrita tanto para as plantas dicotiledóneas como para as plantas monocotiledóneas, por exemplo, para o arroz (Greco et al., 2001, *Plant Physiology* 125, 1175-1177; Liu et al., 1999, *Molecular and General Genetics* 262, 413-420; Hiroyuki et al., 1999, *The Plant Journal* 19 (5), 605-613; Jeon e Gynheung, 2001, *Plant Science* 161, 211-219), cevada (2000, Koprek et

al., The Plant Journal 24 (2), 253-263), *Arabidopsis thaliana* (Aarts et al., 1993, Nature 363,715-717, Schmidt e Willmitzer, 1989, Molecular and General Genetics 220, 17-24; Altmann et al., 1992, Theoretical and Applied Genetics 84, 371-383; Tissier et al., 1999, The Plant Cell 11,1841-1852), tomate (Beizile e Yoder, 1992, The Plant Journal 2 (2), 173-179) e batata (Frey et al., 1989, Molecular and General Genetics 217, 172-177; Knapp et al., 1988, Molecular and General Genetics 213,285-290).

Em princípio, as células das plantas e as plantas de acordo com a presente invenção e o amido produzido por elas podem ser gerados ou produzidos com a ajuda tanto de transposições homólogos como heterólogos, utilização de transposições homólogos também inclui os transposições que já está presentes naturalmente no genoma da planta.

A mutagénese por inserção do ADN-T baseia-se no facto de certos segmentos (ADN-T) dos plasmidos TI de *Agrobacterium* serem capazes de se integrar no genoma das células das plantas. O sítio de integração no cromossoma da planta não é fixo mas pode ter lugar em qualquer posição. Se o ADN-T se integra num segmento do cromossoma que constitui uma função do gene, isto pode levar a uma modificação da expressão do gene e assim pode também levar a uma actividade alterada de uma proteína codificada pelo gene em questão. Em particular, a integração de um ADN-T numa região de codificação de uma proteína frequentemente significa que a proteína em questão já não pode ser sintetizada na forma activa ou não pode ser sintetizada de nenhuma forma pela célula em questão. A utilização de inserções de ADN-T para a geração de mutantes, está descrita, por exemplo, para a *Arabidopsis thaliana* (Krysan et al., 1999, The Plant Cell 11, 2283-2290; Atipiroz-Leehan e Feldmann, 1997, Trends in genetics 13 (4), 152-156;

Parinov e Sundaresan, 2000, *Current Opinion in Biotechnology* 11,157-161) e arroz (Jeon e An, 2001, *Plant Science* 161, 211-219; Jeon et al., 2000, *The Plant Journal* 22 (6), 561-570). Os processos para identificação dos mutantes que tenham sido gerados com a ajuda da mutagénese de inserção de ADN-T estão descritos, *inter alia*, por Young et al., (2001, *Plant Physiology* 125, 513-518), Parinov et al., (1999, *The Plant cell* 11,2263- 2270), Thorneycroft et al., (2001, *Journal of Experimental Botany* 52, 1593-1601) e McKinney et al., (1995, *The Plant Journal* 8 (4), 613-622).

Em princípio, a mutagénese de ADN-T é apropriada para a geração de células de plantas de acordo com a presente invenção e para a produção do amido produzido por elas.

Noutro enquadramento da presente invenção, a presença e/ou a expressão de uma ou mais moléculas estranhas de ácidos nucleicos leva à inibição da expressão de genes endógenos, que codificam as proteínas SSIII, proteínas REI e proteínas REII.

As células de plantas de acordo com a presente invenção podem ser geradas por vários processos que são familiares para os especialistas na matéria, por exemplo, por meio daqueles que levam à inibição da expressão dos genes endógenos, que codificam uma proteína SSIII, REI ou REII. Incluem, por exemplo, a expressão de um ARN anti-paralelo correspondente ou uma estrutura de ARN de hélice dupla, a provisão de moléculas ou vectores que conferem um efeito co-supressão, a expressão de uma ribozima apropriadamente construída, que cliva especificamente os transcriptos que codificam uma proteína SSIII, REI ou REII ou que é conhecido como "mutagénese *in vivo*". Além disso, a redução da actividade de SSIII e/ou REI e/ou REII nas células das plantas podem também

ser conseguidas pela expressão simultânea das moléculas de ARN paralelas e anti-paralelas do gene alvo específico a ser reprimido, preferencialmente, o gene de SSIII e/ou REI e/ou REII. O especialista na matéria está familiarizado com estes processos. Além disso, sabe-se que a geração de moléculas de ARN de hélice dupla *in planta* das sequências promotoras *in trans*, podem levar à metilação e à inativação transcricional de cópias homólogas deste promotor (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201). Outros processos para a redução da actividade das proteínas estão descritos aqui a seguir. Todos estes processos baseiam-se na introdução de uma ou mais moléculas estranhas de ácidos nucleicos no genoma das células das plantas.

Para inibir a expressão dos genes por meio da tecnologia anti-paralela ou de co-supressão é possível utilizar, por exemplo, uma molécula de ADN que englobe todas as sequências que codificam uma proteína SSIII e/ou REI e/ou REII incluindo quaisquer sequências de flaqueio que possam estar presentes ou ainda moléculas de ADN que apenas englobam partes da sequência de codificação, que deve ser suficientemente longa de modo a produzir um efeito anti-paralelo ou um efeito co-supressão nas células. As sequências que são apropriadas normalmente têm um comprimento mínimo não inferior a 15 pb, preferencialmente, um comprimento de 100-500 pb e para uma inibição efectiva anti-paralela ou de co-supressão, em particular, as sequências que têm um comprimento superior a 500 pb.

Outra possibilidade que é apropriada para as abordagens anti-paralelas ou de co-supressão é a utilização de sequências de ADN com um elevado grau de homologia com as sequências endógenas que codificam as proteínas SSIII, REI ou REII e que ocorrem endogenamente nas células da planta. O grau

mínimo de homologia deve exceder, aproximadamente, 65 %. A utilização de sequências com níveis de homologia de, pelo menos 90 %, em particular, entre 95 e 100 %, é a preferida.

A utilização de intrões, isto é, regiões de não codificação de genes, que codificam as proteínas SSIII, ERI e/ou REII são também viáveis para se conseguir um efeito anti-paralelo ou de co-supressão. A utilização de sequências de intrões para a inibição da expressão de genes dos genes que codificam as proteínas que fazem a biossíntese do amido já foi descrita nos pedidos de invenção internacionais WO 97/04112, WO 97/04113, WO 98/37213, WO 98/37214. Um especialista na matéria está familiarizado com os processos para conseguir um efeito anti-paralelo e de co-supressão. O processo de inibição por co-supressão já foi descrito, por exemplo, em Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui e Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al., (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621).

A expressão de ribozimas para a redução da actividade de enzimas específicas em células é também conhecida dos especialistas na matéria e está descrita, por exemplo, na patente de invenção europeia EP-B1 0321201. A expressão de ribozimas em células de plantas já foi descrita, por exemplo, em Feyter et al., (Mol. Gen. Genet. 250, (1996), 329-338).

Além disso, a redução da actividade de SSIII e/ou de REI e/ou de REII nas células de planta pode também ser conseguida por aquilo que é conhecido como "mutagénese *in vivo*", em que um híbrido de oligonucleótidos de ARN-ADN ("quimeroplasto") é

introduzido nas células por meio das células de transformação (Kipp, P. B. et al., Poster Session at the "5th International Congress of Plant Molecular Biology, 21 st-27th September 1997, Singapore; R. A. Dixon e C. J. Arntzen, Meeting report on "Metabolic Engineering in Transgenic Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15, (1997), 441-447; Patente de invenção internacional WO 9515972; Kren et al., Hepatology 25, (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273, (1996), 1386-1389; Beetham et al., 1999, PNAS 96,8774-8778). Parte do componente de ADN do oligonucleótido de ARN-ADN é homólogo de uma sequência de ácidos nucleicos de um gene endógeno de SSIII, REI e/ou REII, mas contém uma mutação em comparação com a sequência de ácidos nucleicos de um gene endógeno de SSIII, REI e/ou REII ou contém uma região heteróloga que está rodeada por regiões homólogas. Devido ao emparelhamento de bases das regiões homólogas do oligonucleótido de ARN-ADN e da molécula endógena de ácido nucleico, seguido da recombinação homóloga, a mutação ou a região heteróloga contidas no componente de ADN do oligonucleótido de ARN-ADN pode ser transferida para o genoma de uma célula da planta. Isto leva a uma redução da actividade de uma ou mais das proteínas SSIII, REI e/ou REII. Além disso, a redução da actividade de SSIII e/ou REI e/ou REII nas células das plantas pode também ser causada pela expressão simultânea das moléculas de ARN paralelas e anti-paralelas do gene alvo específico a ser reprimido, preferencialmente, o gene de SSIII e/ou REI e/ou REII. Isto pode ser conseguido, por exemplo, utilizando as estruturas quiméricas que contêm "repetições invertidas" do respectivo gene alvo ou partes do gene alvo. As estruturas quiméricas codificam as moléculas de ARN paralelas e anti-paralelas do gene alvo em questão. O ARN paralelo e anti-paralelo é sintetizado simultaneamente *in planta* sob a forma de uma molécula de ARN, sendo possível que o ARN paralelo e anti-

paralelo seja separado um do outro por meio de um espaçador e para formar uma molécula de ARN de hélice dupla. Já foi demonstrado que a introdução de estruturas de ADN repetidas inversamente no genoma das plantas é um processo altamente eficaz para reprimir os genes que correspondem às estruturas de ADN repetidas de forma inversa (Waterhouse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, (1998), 13959-13964; Wang e Waterhouse, Plant Mol. Biol. 43, (2000), 67-82; Singh et al., Biochemical Society Transactions Vol. 28 part 6 (2000), 925-927; Liu et al., Biochemical Society Transactions Vol. 28 part 6 (2000), 927-929); Smith et al., (Nature 407, (2000), 319-320; pedido de patente de invenção internacional WO 99/53050 A1). As sequências paralelas e anti-paralelas dos genes-alvo podem também ser expressas separadamente uma da outra por meio de promotores idênticos ou diferentes (Nap, J-P et al., 6th International Congress of Plant Molecular Biology, Quebec, 18-24 Junho, 2000; Poster S7-27, Sessão S7).

A redução da actividade de SSIII e/ou REI e/ou REII nas células das plantas pode assim também ser conseguida gerando moléculas de ARN de hélice dupla do genes de SSIII e/ou REI e/ou REII. Com este fim, prefere-se introduzir no genoma das plantas, repetições invertidas de moléculas de ADN do genes de SSIII e/ou REI e/ou REII ou ADNcs, sendo as moléculas de ADN a ser transcritas (genes de SSIII, REI ou REII ou ADNc ou fragmento destes genes ou ADNcs) sob o controlo de um promotor que governa a expressão das referidas moléculas de ADN.

Além disso, sabe-se que a formação de moléculas de ARN de hélice dupla das moléculas de ADN do promotor em plantas *in trans* pode levar à metilação e à inactivação transcripcional de cópias homólogas destes promotores referidos daqui para a frente como promotores alvo (Mette et al., EMBO J. 19,

(2000), 5194-5201). Assim, é possível, por via da inativação do promotor alvo, reduzir a expressão de genes de um gene alvo específico (por exemplo, gene de SSIII, REI ou REII) que está naturalmente sob o controle deste promotor alvo. Isto significa que as moléculas de ADN que englobam os promotores alvo dos genes a serem reprimidos (genes alvo) estão neste caso, ao contrário da função original dos promotores das plantas, a serem utilizadas não como elementos de controlo para a expressão de genes de ADNcs, mas como as próprias moléculas de moléculas de ADN que podem ser transcritas. Para gerar as moléculas de ARN do promotor alvo, de hélice dupla, *in planta*, onde elas podem estar presentes sob a forma de moléculas de ARN em forma de gancho, é preferível utilizar estruturas que contenham repetições invertidas das moléculas de ADN do promotor alvo, estando as moléculas de ADN do promotor alvo sob o controlo de um promotor que governa a expressão de genes das referidas moléculas de ADN do promotor alvo. Estas estruturas são em seguida introduzidas no genoma das plantas. A expressão das repetições invertidas das referidas moléculas de ADN do promotor alvo leva à formação de moléculas de ARN do promotor alvo, de hélice dupla, *in planta* (Mette et al., EMBO J. 19, (2000), 5194-5201). O promotor alvo pode assim ser inativado. A redução da actividade de SSIII e/ou REI e/ou REII nas células das plantas pode assim ser conseguida gerando moléculas de ARN de hélice dupla das sequências do promotor dos genes de SSIII e/ou REI e/ou REII. Com este fim, é preferível introduzir no genoma das plantas repetições invertidas das moléculas de ADN do promotor de promotores de SSIII e/ou REI e/ou REII, estando as moléculas de ADN do promotor alvo a ser transcritas (promotor de SSIII, REI e/ou REII) sob o controlo de um promotor que governa a expressão das referidas moléculas de ADN do promotor alvo.

Os especialistas na matéria conhecem ainda como atingir a actividade de uma ou mais das proteínas de SSIII, REI e/ou REII por meio da expressão de derivados não funcionais, em particular mutantes transdominantes dessas proteínas e/ou por expressão de antagonistas/inibidores dessas proteínas. Os antagonistas/inibidores dessas proteínas englobam, por exemplo, anticorpos, fragmentos de anticorpos ou moléculas com características de ligação semelhantes. Por exemplo, utilizou-se um anticorpo citoplásmico scFv para a modulação da actividade da proteína de fitocroma A em plantas de tabaco modificadas geneticamente (Owen, Bio/Technology 10 (1992), 790-4; Review: Franken, E, Teuschel, U. e Hain, R., Current Opinion in Biotechnology 8, (1997), 411-416; Whitelam, Trends Plant Sci. 1 (1996), 268-272).

Os promotores úteis para a expressão de ácidos nucleicos que reduzem a actividade de um gene alvo são, por exemplo, o promotor do ARN 35S do vírus em mosaico da couve-flor e o promotor de ubiquitina de milho para a expressão constitutiva, o promotor B33 do gene de patatina (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29), o promotor de MCPI do gene inibidor de metalocarbopeptidase de batata (pedido de patente de invenção húngara HU9801674) ou o promotor GBSSI de batata (pedido de patente de invenção internacional WO 92/11376) para a expressão específica dos tubérculos em batatas ou um promotor que assegura a expressão unicamente em tecidos activos sob o ponto de vista fotossintético, por exemplo, o promotor ST-LS1 (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451), o promotor de Ca/b (ver, por exemplo, as patentes de invenção norte-americanas N°. US 5656496, US 5639952, Bansal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, (1992), 3654-3658) e o promotor SSU de Rubisco (ver, por exemplo, as patentes de invenção norte-americanas N°. US 5034322, US

4962028) ou, para a expressão específica do endosperma, o promotor de glutelina (Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14, (1990), 41-50; Zheng et al., Plant J. 4, (1993), 357-366; Yoshihara et al., FEBS Lett. 383, (1996), 213-218), o promotor Shrunk-1 (Werr et al., EMBO J. 4, (1985), 1373-1380), o promotor HMG de trigo, o promotor USP, o promotor de faseolina ou os promotores dos genes de zeína de milho (Pedersen et al., Cell 29, (1982), 1015-1026; Quatroccio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93). A expressão das moléculas estranhas de ácido nucleico é particularmente vantajosa nos órgãos das plantas que armazenam amido. Exemplos desses órgãos são os tubérculos da planta da batata ou as sementes ou o endosperma do amido de milho, trigo ou arroz. Esta é a razão pela qual se prefere utilizar promotores que conferem expressão nestes órgãos. Contudo, é também possível utilizar promotores que são activados apenas num momento determinado por factores externos (ver, por exemplo, a patente de invenção internacional WO 93/07279). Os promotores que podem ser de particular interesse neste contexto são os promotores das proteínas de choque térmico, que permitem uma indução simples. Outros que podem ser utilizados são os promotores específicos das sementes (lacuna), tais como, por exemplo, o promotor USP *Vicia faba*, que assegura a expressão específica das sementes em *Vicia faba* e noutras plantas (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 669-679; Baumlein et al., Mol. Gen. Genet. 225, (1991), 459-467). Os promotores específicos das frutas, tais como, por exemplo, os descritos na patente de invenção internacional WO 91/01373 podem também ser utilizados. Outro elemento que pode estar presente é uma sequência de terminação, que serve para a terminação correcção da transcrição e para a adição de uma cauda de poli-A ao transcripto, que se acredita que tenha uma função na estabilização dos transcriptos. Esses elementos estão descritos na literatura (ver, por exemplo, Gielen et

al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) e podem ser substituídos conforme desejado.

As células de plantas transgênicas de acordo com a presente invenção, sintetizam um amido modificado cujas propriedades físico-químicas, em particular, o teor de amilose e a relação amilose/amilopectina, o teor de fósforo, o comportamento da viscosidade, a tensão dos geles e a dimensão do grânulo e/ou a morfologia do grânulo, estão modificados em comparação com o amido em plantas naturais, por isso, está mais apropriado para utilizações específicas.

Por isso, a presente invenção também tem por objecto uma célula de planta geneticamente modificada de acordo com a presente invenção, em particular, tem por objecto células de plantas transgênicas, que sintetizam um amido modificado.

Surpreendentemente, verificou-se que a composição do amido nas células das plantas de acordo com a presente invenção estão modificadas de tal forma que o teor de amilose corresponde a, pelo menos 30 % e o teor de fosfato está aumentado e a viscosidade final numa análise por ARV está aumentada, em comparação com o amido de células de plantas, de plantas naturais correspondentes, de tal maneira que este amido é mais apropriado para utilizações específicas. Em particular, os amidos de acordo com a presente invenção têm a vantagem de que gelificam completamente em condições normalizadas apesar do teor aumentado de amilose. Isto melhora marcadamente a capacidade de tratamento do amido em comparação com outros amidos com um maior teor de amilose. Não é necessária portanto uma temperatura maior ou uma pressão maior para a gelificação do amido de acordo com a presente invenção. É esta a razão pela qual se pode dispensar a utilização de aparelhos específicos, tais como, por

exemplo, fornos de jacto, extrusoras ou autoclaves, com os quais se faz a clivagem destes amidos. Outra vantagem dos amidos de acordo com a presente invenção é a de que, quando submetidos a um tratamento com rolos a quente, podem ser aplicados mais tarde sob a forma de uma suspensão. Outros amidos com um teor de amilose aumentado iriam gelificar quando submetidos a este tipo de tratamento, apenas até um determinado limite, se por acaso o fossem e não seriam capazes de serem aplicados com os rolos em questão sob a forma de uma pasta ou de uma película.

Os amidos de acordo com a presente invenção são particularmente apropriados para todas as aplicações em que sejam importantes a capacidade de espessamento, as características de gelificação ou as características de ligação das substâncias adicionadas. O amido de acordo com a presente invenção, é particularmente apropriado para a produção de alimentos, tais como, por exemplo, bens cozinhados, comida instantânea, manjar branco, sopas, pastelaria, chocolate, gelados, polmes para peixe ou carne, sobremesas congeladas ou refeições ligeiras extrudidas. Além disso, o amido de acordo com a presente invenção é apropriado para a produção de gomas, para aplicação em tratamentos têxteis, como aditivo para materiais de construção, para aplicações no domínio da alimentação de animais, como aditivo para cosméticos e no fabrico do papel. O amido que tenha sido isolado de células de plantas de acordo com a presente invenção é particularmente apropriado para a produção de amido pré-gelificado. Os amidos pré-gelificados são amidos fisicamente modificados que são produzidos predominantemente por um tratamento húmido a quente. Em oposição ao amido natural, formam dispersões/pastas ou geles com água fria, consoante a concentração do amido pré-gelificado utilizado e em função do tipo de amido utilizado para a produção do amido pré-

gelificado. Devido a estas características, existe uma serie de aplicações possíveis para os amidos pré-gelificados na indústria alimentar e, além disso, em muitos campos da indústria. A utilização do amido pré-gelificado, também referido como um amido que aumenta de volume a frio, em vez do amido natural, que frequentemente tem a vantagem que os processos de produção podem ser simplificados e encurtados. A produção, por exemplo, de sobremesas instantâneas e manjar branco instantâneo requer amidos pré-gelificados que depois de se terem sido agitados num fluido frio, tal como, por exemplo, água ou leite, formam geles firmes num curto espaço de tempo, como é o caso, por exemplo, um manjar branco que requer aquecimento. Estes requisitos não são cumpridos pelos amidos pré-gelificados comerciais feitos com amido de trigo, amido de batata ou amido de milho. Para obter as características mencionadas antes, são necessários aditivos ao amido pré-gelificado, tal como, gelatina, alginato, carragena e/ou sais inorgânicos no caso de amidos pré-gelificados que estão correntemente disponíveis comercialmente. Esta adição daquilo que é conhecido como adjuvantes não é necessária, por exemplo, após a produção dos amidos pré-gelificados utilizando amidos de acordo com a presente invenção que se isolam de células de plantas de acordo com a presente invenção.

A presente invenção também tem por objecto uma célula de planta de acordo com a presente invenção com um amido modificado, com uma morfologia dos grânulos modificada. Para os fins da presente invenção, a expressão morfologia dos grânulos pretende referir-se à dimensão e à estrutura da superfície dos grânulos de amido natural. O amido é armazenado em órgãos de armazenagem, tais como, por exemplo, tubérculos, raízes, embriões ou endosperma das plantas, sob a forma de uma estrutura cristalina numa forma granular. Os

grânulos de amido nos quais estas estruturas granulares ficam retidas depois de o amido ter sido isolado das células das plantas, são referidos como amido natural. A dimensão média dos grânulos (determinada pelo processo descrito aqui a seguir) do amido natural de acordo com a presente invenção, é marcadamente inferior à do amido natural isolado de plantas naturais. Na micrografia de varrimento electrónico (ver figuras 4 e 5) pode-se ver claramente que, surpreendentemente, os grânulos do amido natural de acordo com a presente invenção têm uma superfície rugosa com muitos poros. A estrutura da superfície dos grânulos do amido natural isolado de plantas selvagens, pelo contrário, é predominantemente lisa na sua estrutura e não se descortinam poros. Tanto a presença de grânulos mais pequenos como a superfície rugosa com os seus poros deve-se ao facto da área da superfície dos grânulos de amido da presente invenção ser consideravelmente maior - para o mesmo volume - do que a área da superfície dos grânulos de amido isolados de plantas naturais. O amido de acordo com a presente invenção é por isso particularmente apropriado para ser utilizado como veículo, por exemplo, para aromatizantes, substâncias activas sob o ponto de vista farmacológico, microrganismos pré-bióticos, pro-bióticos, enzimas ou corantes. Estes amidos são particularmente apropriados para substâncias de coagulação e para o fabrico do papel.

Uma outra aplicação possível para os amidos de acordo com a presente invenção é no domínio da perfuração para a obtenção de matérias-primas. Assim, quando se faz a perfuração para a obtenção de petróleo bruto, devem utilizar-se adjuvantes e/ou lubrificantes que evitam o sobreaquecimento da broca ou da coluna da broca. Devido às suas particulares propriedades de gelificação, o amido de acordo

com a presente invenção é por isso também particularmente apropriado para ser utilizado neste domínio.

A presente invenção também tem por objecto uma célula de plantas de acordo com a presente invenção que contém um amido modificado com um teor de amilose de, pelo menos 30 % e que tem um teor de fosfato aumentado e uma viscosidade final aumentada quando se analisa por meio de um ARV, em comparação com o amido de células de plantas correspondentes, de plantas naturais que não tenham sido modificadas geneticamente.

Em relação com a presente invenção, determina-se o teor de amilose pelo processo de Hovenkamp-Hermelink et al., (Potato Research 31, (1988), 241-246) descrito a seguir para o amido da batata. Este processo pode também ser aplicado a amidos isolados de outras espécies de plantas. Os processos para isolar os amidos são conhecidos pelos técnicos desta matéria.

Para os fins da presente invenção, "teor de fosfato do amido", refere-se ao teor de fosfato ligado covalentemente sob a forma de mono-ésteres de fosfato de amido. Em ligação com a presente invenção, a expressão "teor aumentado de fosfato", significa que o teor total de fosfato do fosfato ligado covalentemente e/ou o teor de fosfato na posição C6 do amido sintetizado em células de plantas de acordo com a presente invenção, está aumentado, preferencialmente, aumentado de, pelo menos 270 %, mais preferencialmente, de pelo menos 300 % e, mais preferencialmente, de pelo menos 350 % em comparação com o amido de células de plantas das plantas naturais correspondentes.

Para os fins da presente invenção, a expressão "teor de fosfato na posição C6", entende-se como significando o teor

dos grupos fosfato que estão ligados ao átomo de carbono na posição "6" dos monómeros de glicose do amido. Em princípio, as posições C2, C3 e C6 das unidades de glicose podem estar fosforiladas no amido *in vivo*. Em ligação com a presente invenção, a determinação do teor de fosfato na posição C6 (=teor de C6 P) pode ser realizada por via da determinação de glicose-6-fosfato por meio de um ensaio enzimático visual (Nielsen et al., Plant Physiol. 105, (1994), 111-117) (ver a seguir).

Em ligação com a presente invenção, a expressão "teor total de fosfato" do amido, refere-se ao teor de fosfato ligado covalentemente nas posições C2, C3 e C6 das unidades de glicose, na forma de mono-ésteres de fosfato de amido. O teor de não glucanos fosforilados tal como (por exemplo, os fosfolípidos) não cabe dentro da expressão de "teor total de fosfato" de acordo com a presente invenção. Os não glucanos fosforilados devem por isso ser eliminados quantitativamente antes de se determinar o teor total de fosfato. Os processos para a separação dos não glucanos fosforilados (por exemplo, os fosfolípidos) e o amido, são conhecidos dos técnicos da matéria. Os processos para a determinação do teor total de fosfato são conhecidos dos técnicos da matéria e estão descritos aqui a seguir.

Num outro enquadramento da presente invenção, as células de plantas de acordo com a presente invenção, sintetizam um amido que têm um teor de fosfato de 40-120 nmole, em particular, 60-110 nmole, preferencialmente, 80-100 C6-P por mg de amido na posição C6 dos monómeros de glicose do amido.

Um protocolo para realizar a análise por ARV está descrito aqui a seguir. Deve-se mencionar, em particular, que a análise por ARV dos amidos da batata normalmente faz-se com

uma suspensão de amido a 8 % (p/p). A documentação incluída com o aparelho "ARVsuper3" (instruções, Newport Scientific Pty Ltd., Investment Support Group, Warriewood NSW 2102, Austrália) recomenda uma suspensão contendo, aproximadamente, 10 % de amido para a análise do amido da batata. Surpreendentemente, verificou-se no caso do amido de plantas de batata relacionadas com a presente invenção, que não é possível utilizar uma suspensão de amido a 8 % (2 g de amido em 25 mL de água) para a análise, dado que a viscosidade final atingiu valores que vão para além do limite do aparelho. É por isso que se utilizou apenas suspensões de amido a 6 % (1,5 g de amido em 25 mL de água) para a análise em ARV em vez das suspensões de amido a 8 %. Em ligação com a presente invenção, "viscosidade final aumentada na análise por ARV" é por isso entendido como significando um aumento de, pelo menos 150 %, especialmente, pelo menos 200 %, em particular, pelo menos 250 %, em comparação com plantas selvagens que não foram geneticamente modificadas. O aumento das viscosidades finais está relacionado com as suspensões de amido a 6 % neste contexto. Em relação com a presente invenção, um amido de batata é, além disso, entendido como significando um amido com, pelo menos 300 URV, especialmente, 400 URV, em particular, 500 URV de viscosidade final na análise por ARV com um teor de amido de 6 %. A determinação dos valores de URV será discutida em detalhe aqui a seguir. Num outro enquadramento preferido, a presente invenção tem por objecto células de plantas de acordo com a presente invenção, que sintetizam um amido modificado que, após gelificação em água, forma um gel com uma tensão de gel aumentada em comparação com o gel feito em amido das células de plantas selvagens correspondentes, que não foram geneticamente modificadas.

Para os fins da presente invenção, a expressão "tensão de gel aumentada", é entendida como significando um aumento da tensão do gel, de preferência, pelo menos 300 %, em particular, pelo menos 500 %, mais preferencialmente, pelo menos 700 % e, ainda mais preferencialmente, pelo menos 800 %, até ao máximo de não mais de 2.000 % ou não mais do que 1.500 % em comparação com a tensão de gel de amido das células de plantas selvagens correspondentes que não foram geneticamente modificadas. Em relação com a presente invenção, a tensão do gel deve ser determinada com a ajuda de um analisador de textura nas condições que se descrevem aqui a seguir. Para preparar os geles de amido, deve-se destruir a estrutura cristalina do amido natural aquecendo numa suspensão aquosa com agitação constante. Isto realizou-se com a ajuda de um analisador rápido de viscosidade (Newport Scientific Pty Ltd., Investmet Support Group, Warriewood NSW 2102, Austrália). Tal como já foi mencionado antes, a suspensão de amido a 8 % foi substituída por uma suspensão de amido apenas a 6 % no caso do amido de plantas da batata, dado que a viscosidades finais das suspensões a 8 % estavam fora do intervalo de operação do aparelho. Para determinar a tensão do gel, as suspensões de amido gelificadas no analisador rápido de viscosidade foram armazenadas durante um certo período de tempo e depois submetidas a uma análise utilizando um analisador de textura. De acordo com isto, as suspensões de amido gelificadas a 8 % foram substituídas por suspensões de amido gelificadas a 6 % para a determinação da tensão do gel.

Num outro enquadramento da presente invenção, o amido modificado, sintetizado nas células de plantas de acordo com a presente invenção distingue-se não apenas por um teor de amilose aumentado em comparação com o amido das plantas selvagens correspondentes como por um teor aumentado de

fosfato e uma viscosidade final aumentada na análise por ARV, mas também por uma distribuição modificada das cadeias laterais.

Num outro enquadramento, a presente invenção tem assim por objecto células de plantas de acordo com a presente invenção que sintetizam um amido modificado, sendo o amido modificado caracterizado por uma distribuição das cadeias laterais modificadas. Noutro enquadramento da presente invenção, a expressão "distribuição modificada das cadeias laterais" é entendida como significando uma redução da quantidade de cadeias laterais curtas com um GP (= grau de polimerização) de 6 a 11 de, pelo menos 10 %, preferencialmente, de pelo menos 15 %, em particular, de pelo menos 30 % e, mais preferencialmente, de pelo menos 50 % em comparação com a quantidade de cadeias laterais curtas com um GP de 6 a 11 de amilopectina das plantas naturais e/ou um aumento no teor de cadeias laterais curtas, com um GP de 6 a 22 de, pelo menos 5 %, preferencialmente, de pelo menos 10 %, em particular, de pelo menos 15 % e, mais preferencialmente, de pelo menos 30 % em comparação com a quantidade de cadeias laterais curtas com um GP de 16 a 22 de amilopectina das plantas naturais.

A quantidade de cadeias laterais curtas determina-se por via da determinação da percentagem de uma cadeia lateral específica no total de todas as cadeias laterais. O total de todas as cadeias laterais determina-se por via da determinação da área total sob os picos que representam os graus de polimerização de GP 6 a 26 na cromatografia CLER. A percentagem de uma cadeia lateral em particular no total de todas as cadeias laterais determina-se por via da determinação da relação entre a área sob o pico que representa esta cadeia lateral no cromatograma da CLER em relação à área

total. Um programa pode ser utilizado para a determinação das áreas do pico é, por exemplo, o Chromelion 6.20 da Dionex, EUA.

Num outro enquadramento da presente invenção, o amido modificado sintetizado nas células das plantas de acordo com a presente invenção, distingue-se não só por um teor aumentado de amilose em comparação com o amido das plantas naturais correspondentes e um teor de fosfato aumentado e uma viscosidade final aumentada na análise por ARV, mas também por um "perfil de cadeias laterais com um GP 12 a 18" modificado e/ou por um "perfil de cadeias laterais com um GP 19 a 24" modificado e/ou por um "perfil de cadeias laterais com um GP 25 a 30" modificado e/ou por um "perfil de cadeias laterais com um GP 37 a 42" modificado e/ou por um "perfil de cadeias laterais com um GP 62 a 123" modificado.

Em relação com a presente invenção, a expressão "perfil de cadeia lateral com um GP 12 a 18" entende-se como significando uma redução da quantidade de cadeias laterais de amilopectina, com um GP 12 a 18 de pelo menos 25 %, preferencialmente, de pelo menos 35 %, mais preferencialmente, de pelo menos 45 %, e, ainda mais preferencialmente, de pelo menos 55 % em comparação com a quantidade de cadeias laterais de amilopectina com um GP 12 a 18 de plantas naturais.

Em relação com a presente invenção, a expressão "perfil de cadeia lateral com um GP 19 a 24" entende-se como significando uma redução da quantidade de cadeias laterais de amilopectina, com um GP 19 a 24 de pelo menos 10 %, preferencialmente, de pelo menos 20 % e, mais preferencialmente, de pelo menos 30 % em comparação com a quantidade

de cadeias laterais de amilopectina com um GP 19 a 24 de plantas naturais.

Em relação com a presente invenção, a expressão "perfil de cadeia lateral com um GP 25 a 30" entende-se como significando uma redução da quantidade de cadeias laterais de amilopectina, com um GP 25 a 30 de pelo menos 5 % em comparação com a quantidade de cadeias laterais de amilopectina com um GP 25 a 30 de plantas naturais.

Em relação com a presente invenção, a expressão "perfil de cadeia lateral com um GP 37 a 42" entende-se como significando uma redução da quantidade de cadeias laterais de amilopectina, com um GP 37 a 42 de pelo menos 5 %, preferencialmente, de pelo menos 10 % e, mais preferencialmente, de pelo menos 15 % em comparação com a quantidade de cadeias laterais de amilopectina com um GP 37 a 42 de plantas naturais.

Em relação com a presente invenção, a expressão "perfil de cadeia lateral com um GP 62 a 123" entende-se como significando uma redução da quantidade de cadeias laterais de amilopectina, com um GP 62 a 123 de pelo menos 20 %, preferencialmente, de pelo menos 35 % e, mais preferencialmente, de pelo menos 50 % em comparação com a quantidade de cadeias laterais de amilopectina com um GP 62 a 123 de plantas naturais.

O perfil da cadeia lateral determina-se por via da percentagem de um grupo específico de cadeias laterais no total de todas as cadeias laterais cromatograma da CFG (cromatografia em fase gasosa). Com este fim, divide-se a área total sob a linha do cromatograma da CFG em segmentos individuais, cada um dos quais representa grupos de cadeias

laterais de diferentes comprimentos. Os segmentos escolhidos contêm cadeias laterais com o seguinte grau de polimerização (GP = número de monómeros de glicose dentro de uma cadeia lateral): GP $\leq$ 11, GP 12-18, GP 19-24, GP 25-30, GP 31-36, GP 37-42, GP 43-48, GP 49-55, GP 56-61 e GP 62-123. Para relacionar o volume de eluição com a massa molecular, faz-se a calibração da coluna de CFG utilizada com padrões de dextrano (Fluka, Product# 31430). Os dextransos utilizados, a sua massa molecular associada e os volumes de eluição, estão indicados na figura 9. Utilizando o gráfico de calibração resultante, mostra-se o diagrama de eluição com uma distribuição do peso molecular. Para determinar o peso molecular das cadeias laterais individuais, estabelece-se um peso molecular de 162 para a glicose. A área total sob a linha do cromatograma da CFG está fixada como 100 % e a percentagem das áreas dos segmentos individuais é calculada com base na percentagem da área total.

Num outro enquadramento especialmente preferido, a amilopectina do amido de acordo com a presente invenção, de células de plantas de acordo com a presente invenção, mostra uma quantidade aumentada das cadeias laterais de amilopectina com um GP maior do que 123 em comparação com a quantidade de cadeias laterais com um GP maior do que 123 da amilopectina de plantas naturais.

As células de plantas de acordo com a presente invenção podem ser utilizadas para a regeneração de plantas intactas.

As plantas que se podem obter por regeneração das células de plantas transgênicas de acordo com a presente invenção são do mesmo modo um dos temas da presente invenção.

As células de plantas de acordo com a presente invenção podem pertencer a qualquer espécie de plantas, isto é, tanto a plantas monocotiledóneas como a plantas dicotiledóneas. Preferencialmente, são células de plantas úteis na agricultura, isto é, plantas que crescem por acção do homem para fins da nutrição ou para domínios técnicos, em particular, para fins industriais. A presente invenção tem por objecto, preferencialmente, plantas que formam fibras (por exemplo, linho, cânhamo, algodão), plantas que armazenam óleo (por exemplo, óleo de semente de colza, couve flor, soja), plantas que armazenam açúcar (por exemplo, beterraba açucareira, cana do açúcar, painço açucareiro) e plantas que armazenam proteínas (por exemplo, legumes). Num outro enquadramento preferido, a presente invenção tem por objecto plantas para alimentar animais, em particular, ervas para alimentar os animais e ervas de forragem (alfafa, trevo e similares) e plantas vegetais (por exemplo, tomate, alface, chicória). Num enquadramento preferido, a presente invenção tem por objecto células de plantas que armazenam amido (por exemplo, trigo, cevada, aveia, centeio, batata, milho, arroz, ervilhas, mandioca) sendo as células de plantas de batata as especialmente preferidas.

Está disponível uma multiplicidade de técnicas para a introdução de ADN numa célula hospedeira de plantas. Estas técnicas englobam a transformação das células de plantas com ADN-T utilizando como agentes de transformação *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*, a fusão de protoplastos, a injeção, a electroporação de ADN, a introdução do ADN por meio de uma abordagem biolística e outras possibilidades. A utilização da transformação das células das plantas mediada por agrobactérias tem sido estudada intensivamente e tem sido descrita suficientemente na patente de invenção europeia EP 120516; Hoekema, IN: The Binary Plant

Vector System Offsetdrukkerij Kanters B. V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 e em An et al., EMBO J. 4, (1985), 277-287. No que respeita à transformação da batata, ver, por exemplo, Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33).

A transformação das plantas monocotiledóneas por meio de vectores com base na transformação com agrobactérias também já foi descrita (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al., Science in China 33, (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May et al., Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner e Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al., Transgenic Res. 2, (1993), 252-265). Um sistema alternativo para a transformação de plantas monocotiledóneas é a transformação por meio da abordagem biolística (Wan e Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631), transformação de protoplastos, a electroporação de células parcialmente permeabilizáveis, a introdução de ADN por meio de fibras de vidro. Em particular, a transformação do milho tem sido repetidamente descrita na literatura (ver, por exemplo, a patente de invenção internacional WO 95/06128, as patentes de invenção europeias EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm et al., Biotechnology 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2, (1990), 603-618; Koziel et al., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726). A transformação feita com sucesso de outras espécies de cereais também já foi descrita, por exemplo, para a cevada (Wan e Lemaux, ver antes; Ritala et al., ver antes; Krens et al., Nature 296, (1982), 72-74) e trigo (Nehra et al., Plant J. 5, (1994), 285-297). Todos os

processos mencionados antes para são apropriados para os fins da presente invenção. Qualquer promotor que seja activo nas células das plantas é geralmente apropriado para a expressão de moléculas de ácido nucleico estranhas. O promotor pode ser escolhido de tal forma que a expressão nas plantas de acordo com a presente invenção tenha lugar constitutivamente ou apenas num tecido específico, num momento particular do desenvolvimento da planta ou num momento determinado por factores externos. No que respeita à planta, o promotor pode ser homólogo ou heterólogo.

Noutro enquadramento da presente invenção, pelo menos um ARN anti-paralelo é expresso nas células das plantas de modo a reduzir a actividade de uma ou mais das proteínas SSIII e/ou das proteínas e/ou das proteínas REII.

A presente invenção tem por isso por objecto uma célula de planta de acordo com a presente invenção em que as referidas moléculas de ácidos nucleicos estranhas seleccionam-se no grupo que consiste em

- a) moléculas de ADN que codificam, pelo menos, um ARN anti-paralelo, que provoca uma redução da expressão de, pelo menos, um gene endógeno que codifica as proteínas SSIII e/ou as proteínas REI e/ou as proteínas REII;
- b) moléculas de ADN que, por via de um efeito de co-supressão, levam à redução da expressão de, pelo menos, um gene endógeno que codifica as proteínas SSIII e/ou as proteínas REI e/ou as proteínas REII;
- c) moléculas de ADN que codificam, pelo menos, uma ribozima, que cliva especificamente os transcriptos de, pelo menos, um gene endógeno que codifica as proteínas SSIII e/ou as proteínas REI e/ou as proteínas REII; e

- d) moléculas de ácidos nucleicos introduzida por meio de mutagênese *in vivo*, que levam a uma mutação ou inserção de uma sequência heteróloga em, pelo menos, um gene endógeno que codifica as proteínas SSIII e/ou as proteínas REI e/ou as proteínas REII, provocando essa mutação ou inserção uma redução da expressão de, pelo menos, um gene que codifica as proteínas SSIII e/ou as proteínas REI e/ou as proteínas REII ou a síntese de proteínas SSIII e/ou REI e/ou REII inactivas;
- e) moléculas de ADN que codificam simultaneamente, pelo menos, um ARN anti-paralelo e, pelo menos, um ARN paralelo, em que o referido ARN anti-paralelo e o referido ARN paralelo formam uma molécula de ARN de hélice dupla, que provoca uma redução da expressão de, pelo menos, um gene endógeno, que codifica as proteínas SSIII e/ou as proteínas REI e/ou as proteínas REII;
- f) moléculas de ADN que contêm transposões, levando a integração de sequências de transposões a uma mutação ou a uma inserção em, pelo menos, um dos genes endógenos que codificam as proteínas SSIII e/ou as proteínas REI e/ou as proteínas REII, que provocam uma redução da expressão de, pelo menos, um gene que codifica as proteínas SSIII e/ou as proteínas REI e/ou as proteínas REII ou resulta na síntese de proteínas SSIII e/ou REI e/ou REII inactivas;
- g) Moléculas de ADN-T que, devido à inserção de pelo menos um gene endógeno que codifica as proteínas SSIII e/ou as proteínas REI e/ou as proteínas REII provoca uma redução da expressão de, pelo menos, um gene endógeno que codifica as proteínas SSIII e/ou as proteínas REI e/ou

as proteínas REII ou que resulta na síntese de proteínas SSIII e/ou REI e/ou REII inactivas.

Num outro aspecto, a presente invenção tem por objecto qualquer espécie de material de propagação de plantas de acordo com a presente invenção.

Num outro aspecto da presente invenção tem por objecto a utilização das moléculas de ácidos nucleicos aqui descritas para gerar células de plantas e plantas de acordo com a presente invenção.

Descrição das figuras

Fig. 1:

Representação gráfica das características de viscosidade do amido de plantas da batata. Realizou-se a análise utilizando um analisador rápido de viscosidade (Newport Scientific Pty Ltd., Investmet Support Group, Warriewood NSW 2102, Austrália). As condições em que se realizou a análise estão descritas no processo analítico 1 de ARV no capítulo "Processos Gerais". O amido do ensaio foi isolado de tubérculos de plantas naturais (PN), plantas com uma reduzida actividade de uma proteína SSIII e de uma proteína REI (038VL008 e 038VL107) ou de plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e uma proteína REI e uma proteína REII (110CF003 e 108CF041). Isolou-se o amido pelo processo descrito em "Exemplos", "Processo de Extracção do Amido de Batatas".

Fig. 2:

Representação gráfica das características de viscosidade do amido de plantas da batata. Realizou-se a análise utilizando um analisador rápido de viscosidade (Newport

Scientific Pty Ltd., Investmet Support Group, Warriewod NSW 2102, Austrália). As condições em que se realizou a análise estão descritas no processo analítico 2 de ARV no capítulo "Processos Gerais". O amido do ensaio foi isolado de tubérculos de plantas naturais (PN), plantas com uma reduzida actividade de uma proteína SSIH e de uma proteína REI (038VL008 e 038VL107) ou de plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIH e uma proteína REI e uma proteína REH (110CF003 e 108CF041). Isolou-se o amido pelo processo descrito em "Exemplos", "Processo de Extracção do Amido de Batatas".

Fig. 3:

Representação gráfica das características de viscosidade do amido de plantas da batata. Realizou-se a análise utilizando um analisador rápido de viscosidade (Newport Scientific Pty Ltd., Investmet Support Group, Warriewod NSW 2102, Austrália). As condições em que se realizou a análise estão descritas no processo analítico 3 de ARV no capítulo "Processos Gerais". O amido do ensaio foi isolado de tubérculos de plantas naturais (PN), plantas com uma reduzida actividade de uma proteína SSIH e de uma proteína REI (038VL008 e 038VL107) ou de plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIH e uma proteína REI e uma proteína REH (110CF003 e 108CF041). Isolou-se o amido pelo processo descrito em "Exemplos", "Processo de Extracção do Amido de Batatas".

Fig. 4:

Micrografia de varrimento electrónico de um grânulo de amido de batata isolado de plantas naturais.

Fig. 5:

Micrografia de varrimento electrónico de um grânulo de batata isolado de plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSI^{III} e de uma proteína ERI e de uma proteína ERI^{II} (110CF003).

Fig. 6:

Representação esquemática do vector pGSV71- α -ERI^{II}-basta, que foi utilizado para uma nova transformação de plantas nas quais se tinha observado uma actividade reduzida de uma proteína SSI^{III} e de uma proteína REI. (BE, bordo esquerdo de ADN-T, BD, bordo direito de ADN-T; CaMV35, promotor 35S do vírus do mosaico de couve flor; NOS, sequência de poliadenilação do gene de opalina-sintase de *Agrobacterium tumefaciens*; OCS, sequência de poliadenilação do gene de octopina-sintase de *Agrobacterium tumefaciens*; B33, promotor do gene da patatina da batata; ERI^{II}, sequências de codificação do gene ERI^{II} da batata; barra, sequência que codifica uma fosfinotricina-acetiltransferase de *Streptomyces hygroscopicus*).

Fig. 7:

Representação esquemática do vector pB33- α -ER- α -SSI^{III}-Kan, que se utilizou para a geração de plantas transgénicas com uma actividade reduzida de uma proteína SSI^{III} e de uma proteína ERI (BE, bordo esquerdo de ADN-T, BD, bordo direito de ADN-T; nos5', promotor do gene de opalina-sintase de *Agrobacterium tumefaciens*; nptII, gene que codifica a actividade de uma neomicina-fosfotransferase; nos3, sequência de poliadenilação do gene de opalina-sintase de *Agrobacterium tumefaciens*; OCS, sequência de poliadenilação do gene de octopina-sintase de *Agrobacterium tumefaciens*; B33, promotor do gene da patatina da batata; ERI^{II}, sequências de codificação do gene ERI^{II} da batata; ER, sequências de

codificação do gene ERI da batata; SSIII, sequências de codificação do gene SSIII da batata).

Fig. 8:

A figura mostra todo o diagrama de eluição da amilopectina de amidos das linhas 038VL008, 108CF041 e de tipo natural. Tal como se mostrou na figura, a quantidade de cadeias laterais maiores na linha 108CF041 é marcadamente superior em comparação com 038VL008 inicial e/ou a correspondente de tipo natural.

Fig. 9.

Curva de calibração e quadro com os padrões de dextrano correspondentes.

Fig. 10:

A figura mostra todo o diagrama de eluição da amilopectina dos amidos das linhas 038VL008, 108CF041 e do tipo natural. Ao contrário da Fig. 8, o eixo do x não mostra o volume de eluição, mas o peso molecular. O diagrama de eluição da Fig. 8 em função da distribuição do peso molecular é mostrado com a ajuda do gráfico de calibração da Fig. 9.

Fig. 11:

Esta figura representa a distribuição dos perfis das cadeias laterais da amilopectina de plantas da linha 038VL008 em comparação com o perfil de cadeias laterais de amilopectina de plantas naturais.

Fig. 12:

Esta figura representa a distribuição dos perfis das cadeias laterais da amilopectina de plantas da linha

108CF041 em comparação com o perfil de cadeias laterais de amilopectina de plantas naturais.

Descrição das Sequências

SEQ ID N°. 1:

Sequência de ácidos nucleicos da sintase do amido da batata (*Solanum tuberosum*) SSIII com a indicação das sequências que codificam a correspondente proteína SSIII.

SEQ ID N°. 2:

Sequência de aminoácidos de uma proteína SSIII da batata.

SEQ ID N°. 3:

Sequência de aminoácidos do domínio de ligação Pfam cbm25 da proteína SSIII da batata (*Solanum tuberosum*).

SEQ ID N°. 4:

Sequência de ácidos nucleicos que codifica a enzima de ramificação ERI da batata (*Solanum tuberosum*).

SEQ ID N°. 5:

Sequência de aminoácidos da enzima de ramificação ERI da batata (*Solanum tuberosum*).

SEQ ID N°. 6:

Sequência de ácidos nucleicos que codifica a enzima de ramificação ERII da batata (*Solanum tuberosum*).

SEQ ID N°. 7:

Sequência de aminoácidos da enzima de ramificação ERII da batata (*Solanum tuberosum*).

SEQ ID N°. 8:

Sequência de ácidos nucleicos amplificada por RCP da enzima de ramificação ERII da batata (*Solanum tuberosum*).

Processos Gerais

Os processos que se seguem foram utilizados nos exemplos:

Análise do amido

a) Determinação do teor de amilose e a relação entre amilose/amilopectina

Isolou-se o amido de plantas da batata por processos normalizados e determinou-se o teor de amilose e a relação amilose/amilopectina pelo processo descrito por Hovenkamp-Hermelink et al., (Potato Research 31, (1988), 241-246).

b) Determinação do teor de fosfato

No amido, as posições C2, C3 e C6 das unidades de glicose podem estar fosforiladas. Para determinar o teor de C6-P do amido, hidrolisou-se 50 mg de amido, durante 4 horas, a 95 °C, no seio de 500 µL de HCl 0,7 M. Centrifugaram-se então as amostras durante 10 minutos, a 15.500 g e eliminaram-se os sobrenadantes. Misturou-se 7 µL dos sobrenadantes com 193 µL de tampão de imidazole (imidazole 100 mM, a pH 7,4; MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM e NAD 0,4 mM). A medição realizou-se num fotómetro a 340 nm. Depois de se ter estabelecido a base de absorção, Iniciou-se a reacção enzimática por adição de 2 unidades de glicose-6-fosfato desidrogenase (de *Leuconostoc mesenteroides*, Boehringer Mannheim). A alteração

na absorção é directamente proporcional à concentração do teor de G-6-P do amido.

Determinou-se o teor total de fosfato pelo processo de Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118). Tratou-se aproximadamente 50 mg de amido com 30 μ L de uma solução etanólica de nitrato de magnésio e incinerou-se durante 3 horas, a 500 °C numa mufla. Tratou-se o resíduo com 300 μ L de ácido clorídrico 0,5 M e incubou-se durante 30 minutos, a 60 °C. A seguir preparou-se uma aliquota até 300 μ L de ácido clorídrico 0,5 M e adicionou-se a uma mistura de 100 μ L de ácido ascórbico a 10 % e 600 μ L de molibdato de amónio a 0,42 %, no seio de ácido sulfúrico 2 M e incubou-se durante 20 minutos, a 45 °C. Isto foi seguido de uma determinação fotométrica a 820 nm com uma série de calibrações com fosfato como padrão.

c) Determinação da tensão do gel (Analisador da Textura)

Gelificou-se 1,5 g de amido (DM) num aparelho de ARV, no seio de 25 mL de uma suspensão aquosa (programa de temperatura: ver alínea d) "Determinação das características da viscosidade por meio de um analisador rápido de viscosidade (ARV)" e em seguida armazenou-se durante 24 horas, à temperatura ambiente, numa embalagem selada. Fixaram-se as amostras sob a sonda (pistão redondo com uma superfície plana) de um analisador de textura TA-XT2 da Stable Micro Systems (Surrey, RU) e determinou-se a tensão do gel utilizando os seguintes parâmetros:

- Velocidade de ensaio - 0,5 mm/s
- Profundidade da penetração 7 mm
- Superfície de contacto 113 mm²
- Pressão 2 g

d) Determinação das características da viscosidade por meio de um analisador rápido de viscosidade (ARV)

Processo padrão

Colocou-se 2 g de amido (DM) no seio de 25 mL de H₂O (água do tipo VE, condutividade de pelo menos 15 mega ohm) e utilizou-se para a análise num analisador rápido de viscosidade (Newport Scientific Pty Ltd., Investmet Support Group, Warriewod NSW 2102, Austrália). O aparelho funcionou de acordo com as instruções do fabricante. Os valores da viscosidade estão indicados em URVs de acordo com o manual de operação do fabricante, cuja descrição se incorpora aqui como referência. Para determinar a viscosidade da solução aquosa de amido, aquece-se primeiro a suspensão de amido durante um minuto a 50 °C (etapa 1) e depois aquece-se desde 50 °C até 95 °C, a uma taxa de 12 °C por minuto (etapa 2). Manteve-se a temperatura durante 2,5 minutos, a 95 °C (etapa 3). Depois, arrefeceu-se a solução de 95 °C para 50 °C a uma taxa de 12 °C por minuto (etapa 4). Determinou-se a viscosidade durante toda a duração do ensaio.

Em particular nos casos em que os limites do intervalo de medição do ARV foram insuficientes quando se pesou 2,0 g (DM) de amido em 25 mL de H₂O (água do tipo VE, condutividade de pelo menos 15 mega ohm), utilizou-se apenas 1,5 g do amido (DM), no seio de 25 mL de H₂O (água do tipo VE, condutividade de pelo menos 15 mega ohm).

Por razões de comparação com a técnica anterior, utilizou-se ainda um perfil modificado da temperatura nalguns casos. Utilizaram-se os seguintes perfis de temperatura:

Processo analítico 1 de ARV:

Para determinar a viscosidade de uma solução aquosa a 6 % de amido, agitou-se primeiro a suspensão de amido durante 10 segundos a 960 rpm e em seguida aqueceu-se a 50 °C, a uma velocidade de agitação a 160 rpm, inicialmente durante um minuto (etapa 1). Depois, subiu-se a temperatura de 50 °C para 95 °C, a uma taxa de aquecimento de 12 °C por minuto (etapa 2). Manteve-se a temperatura durante 2,5 segundos a 95 °C (etapa 3) e depois arrefeceu-se de 95 °C para 50 °C, a uma taxa de 12 °C por minuto (etapa 4). Na última etapa (etapa 5), manteve-se a temperatura de 50 °C durante 2 minutos. Depois do programa ter terminado, retirou-se o agitador e cobriu-se a proveta. O amido gelificado ficou então disponível para a análise da textura passadas 24 horas.

Processo analítico 2 de ARV:

Para determinar a viscosidade de uma solução aquosa a 6 % de amido, agitou-se primeiro a suspensão de amido durante 10 segundos a 960 rpm e em seguida aqueceu-se a 50 °C, a uma velocidade de agitação a 160 rpm, inicialmente durante dois minutos (etapa 1). Depois, subiu-se a temperatura de 50 °C para 95 °C, a uma taxa de aquecimento de 1,5 °C por minuto (etapa 2). Manteve-se a temperatura durante 15 minutos a 95 °C (etapa 3) e depois arrefeceu-se de 95 °C para 50 °C, a uma taxa de 1,5 °C por minuto (etapa 4). Na última etapa (etapa 5), manteve-se a temperatura de 50 °C durante 15 minutos. Depois do programa ter terminado, retirou-se o agitador e cobriu-se a proveta. O amido gelificado ficou então disponível para a análise da textura passadas 24 horas.

Processo analítico 3 de ARV:

Para determinar a viscosidade de uma solução aquosa a 10 % de amido, agitou-se primeiro a suspensão de amido durante

10 segundos a 960 rpm e em seguida aqueceu-se a 50 °C, a uma velocidade de agitação a 160 rpm, inicialmente durante dois minutos (etapa 1). Depois, subiu-se a temperatura de 50 °C para 95 °C, a uma taxa de aquecimento de 1,5 °C por minuto (etapa 2). Manteve-se a temperatura durante 15 minutos a 95 °C (etapa 3) e depois arrefeceu-se de 95 °C para 50 °C, a uma taxa de 1,5 °C por minuto (etapa 4). Na última etapa (etapa 5), manteve-se a temperatura de 50 °C durante 15 minutos. Este perfil de análise de ARV corresponde ao utilizado na patente de invenção internacional WO 9634968. Depois do programa ter terminado, retirou-se o agitador e cobriu-se a proveta. O amido gelificado ficou então disponível para a análise da textura passadas 24 horas.

O perfil da análise de ARV contém parâmetros que se mostram para comparação das diferentes medições e substâncias. No contexto da presente invenção, os termos que se seguem devem ser entendidos com os significados que se dão a seguir:

1. Viscosidade máxima (ARV Max)

A viscosidade máxima é entendida como significando o máximo valor de viscosidade, medido em URVs, obtido na etapa 2 ou na etapa 3 do perfil de temperatura.

2. Viscosidade mínima (ARV Min)

A viscosidade mínima é entendida como significando o menor valor de viscosidade, medido em URVs, observado no perfil de temperatura depois da viscosidade máxima. Normalmente tem lugar na etapa 3 do perfil de temperatura.

3. Viscosidade final (ARV Fin)

A viscosidade final é entendida como significando o valor de viscosidade, medido em URVs, observado no final da medição.

4. Retrogradação (ARV Ret)

O que é conhecido como "retrogradação" calcula-se subtraindo o valor da viscosidade final da viscosidade mínima que ocorre após a viscosidade máxima na curva.

5. Temperatura de gelificação (T ARV)

A temperatura de gelificação é entendida como significando o momento do perfil da temperatura em que, pela primeira vez, a viscosidade aumenta drasticamente durante um breve período de tempo.

e) Análise da distribuição das cadeias laterais de amilopectina por meio de cromatografia de permuta iônica

Para separar a amilose e a amilopectina, dissolveram-se 200 mg de amido no seio de reactores de 50 mL, utilizando 12 mL de DMSO a 90 % (v/v) no seio de H₂O. Após a adição de 3 volumes de etanol, separou-se o precipitado por centrifugação durante 10 minutos a cerca de 1.800 g à temperatura ambiente (TA). Lavou-se então os peletes com 30 mL de etanol, secaram-se e dissolveram-se no seio de 40 mL de uma solução de NaCl a 1 % (p/v), a 75 °C. Depois arrefeceu-se a solução para 30 °C, adicionou-se, lentamente, aproximadamente 90 mg de timol e incubou-se esta solução durante, pelo menos 60 horas, a 30 °C. Centrifugou-se então a solução durante 30 minutos a 2.000 g (TA). Tratou-se então o sobrenadante com 3 volumes de

etanol e a amilopectina que assentou, foi separada por centrifugação durante 5 minutos, a 2.000 g (TA). Os peletes (amilopectina) são então lavados com etanol e secou-se utilizando acetona. Adicionando DMSO aos peletes, obteve-se uma solução a 1 %, de que se tratou 200 µL com 345 µL de água, 10 µL de acetato de sódio 0,5 M (pH 3,5) e 5 µL de isoamilase (diluição a 1:10; Megazyme) e incubou-se durante cerca de 16 horas, a 37 °C. Em seguida filtrou-se uma diluição aquosa a 1:5 deste soluto através de um filtro de 0,2 µm e fez-se a análise de 100 µL do filtrado por cromatografia iónica (HPAEC-PAD, Dionex). Realizou-se a separação utilizando uma coluna PA-100 (com uma pré-coluna apropriada), enquanto se faz a detecção amperometricamente. As condições de eluição são as seguintes:

Solução A - NaOH 0,15 M

Solução B - Acetato de sódio 1 M no seio de NaOH 0,15 M

Quadro 1: Composição do tampo de eluição para a análise das cadeias laterais da amilopectina em diferentes momentos durante a análise com HPEAC-PAD Dionex. Entre os momentos estabelecidos a composição do tampão de eluição varia em cada caso linearmente.

t (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
5	0	100
35	30	70
45	32	68
60	100	0
70	100	0
72	0	100
80	0	100
Paragem		

A determinação da quantidade relativa de cadeias laterais no total de todas as cadeias laterais realiza-se por via da determinação da percentagem de uma cadeia lateral particular no total de todas as cadeias laterais. O total de todas as cadeias laterais é determinado por via da determinação da área total sob os picos que representa os graus de polimerização de GP6 a 26 no cromatograma da CLER. A percentagem de uma cadeia lateral particular no total de todas as cadeias laterais é determinada por via da determinação da relação entre a área sob o pico que representa esta cadeia lateral no cromatograma da CLER em relação à área total. O programa Chromelion 6.20 Versão 6.20 da Dionex, EUA, foi utilizado para a determinação das áreas dos picos.

f) Determinação da dimensão dos grânulos

Extraíu-se o amido de tubérculos de batata por processos normalizados (ver exemplos).

Fez-se a determinação da dimensão dos grânulos utilizando um fotomedidor de sedimentos do tipo "Lumosed FS1" da Retsch GmbH, Alemanha, utilizando o software V. 2.3. Os parâmetros do software foram os seguintes:

Dados da substância:	Calibração N°. 0
	Densidade [kg/m ³] 1500
Fluido de sedimentação:	Água Tipo
	Viscosidade [Pa s] 0,001
	Densidade [kg/m ³] 1.000
	Adição -
	Registos 5 min
	Interrupção [µm] 250
	Passagem [%] 100
	Interv. de medição 4,34-117,39 µm

Calibração	N
Temperatura	20 °C

A distribuição da dimensão dos grânulos foi determinada numa solução aquosa e realizou-se seguindo as instruções do fabricante e com base na literatura, por exemplo, de H. Pitsch, Korngrößenbestimmung [determinação da dimensão do grânulo]; LABO-1988/3 Fachzeitschrift für Labortechnik, Darmstadt.

g) Micrografias por varrimento electrónico (MVE)

Para estudar a superfície das amostras de amido, transformou-se o amido em pó sobre um substrato para amostras utilizando um adesivo condutor. Para evitar a formação de cargas, os suportes de amostra foram finalmente bombardeados com um revestimento de Pt 4 nm. As amostras de amido foram estudadas utilizando um microscópio electrónico de varrimento de emissão de campo JSM 6330 F (Jeol) com uma voltagem de aceleração de 5 kV.

h) Determinação da actividade das proteínas SSIII, ERI e ERII

Realizou-se tal como especificado nos exemplos.

Exemplos

Geração do vector de expressão ME5/6

O pGSV71 é um derivado do plasmido pGSV7, que é um derivado do vector intermédio pGSV1. O pGSV1 é um derivado de pGSC1700, cuja produção foi descrita por Cornelissen e Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989), 19-25).

Obteve-se pGSV1 a partir de pGSC1700 eliminando o gene de resistência à carbenicilina e eliminando as sequências de ADN-T da região de ADN-TL do plasmido pTiB6S3. O pGSV7 contém a origem de replicação do plasmido pBR322 (Bolivar et al., Gene 2, (1977), 95-113) e a origem de replicação do plasmido pVS1 de *Pseudomonas* (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 contém adicionalmente o gene marcador seleccionável *aadA*, do transposição Tn1331 de *Klebsiella pneumoniae*, que confere resistência aos antibióticos espectinomicina e estreptomicina (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky e Crosa, Plasmid 29 (1), (1993), 31-40). Obteve-se o plasmido pGSV71 fazendo a clonagem de um gene quimérico *bar* entre as regiões de fronteira do pGSV7. O gene quimérico *bar* contém a sequência promotora do vírus de mosaico de couve flor para a iniciação transcricional (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), o gene *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) e a região 3' não traduzida do gene de nopalina-sintase do ADN-T, pTiT37, para a terminação transcricional e para a poliadenilação. O gene *bar* confere tolerância ao herbicida glufosinato de amónio. O ADN-T contém a sequência do bordo direito do ADN-TL do plasmido pTiB6S3 (Gielen et al., EMBO J. 3, (1984), 835-846) nas posições 198-222. Uma sequência de poli-ligações está localizada entre os nucleótidos 223-249. Os nucleótidos 250-1.634 contém a região promotora p35S3 do vírus em mosaico de couve-flor (Odell et al., ver antes). A sequência de codificação do gene de resistência à fosfinotricina de *Streptomyces hygroscopicus* (*bar*) (Thompson et al., 1987, ver antes) está arranjado entre os nucleótidos 1.635-2.186. Os codões terminais nas extremidades 5' do gene de tipo selvagem *bar* foram substituídos pelos codões ATG e GAC. Uma sequência de poli-ligações está localizada entre os nucleótidos 2.187-2.205. O fragmento TaqI de 260 pb da extremidade 3' não traduzida do gene de nopalina-sintase (3'nos) do ADN-T do

plasmido pTiT37 (Depicker et al., J. Mol. Appl. Genet. 1, (1982), 561-573) está localizado entre os nucleótidos 2.206 e 2.465. Os nucleótidos 2.466-2.519 contêm uma sequência de poli-ligação. A sequência do bordo esquerdo do ADN-TL do plasmido pTiB6S3 (Gielen et al., EMBO J. 3, (1984), 835-846) está localizada entre os nucleótidos 2.520-2.544. Cortou-se então o vector pGSV71 utilizando a enzima PstI e tornou-se a extremidade cega. O promotor B33 e a cassete ocs foram então excisados a partir do vector pB33-Kan sob a forma de um fragmento de *EcoRI-HindIII*, que se tornou cego e se inseriu no vector pGSV71, que tinha sido cortado com PstI e que se tinha tornado cego. O vector resultante foi utilizado como vector inicial para a produção de ME5/6: Introduziu-se um oligonucleótido contendo os sítios de clivagem *EcoRI*, *PacI*, *SpeI*, *SrfI*, *SpeI*, *NotI*, *PacI* e *EcoRI*, no sítio de clivagem de PstI no vector ME4/6 localizado entre o promotor B33 e o elemento ocs, duplicando o sítio de clivagem de PstI. O vector de expressão resultante foi designado por ME5/6.

Descrição do vector pSK-Pac:

O pSK-Pac é um derivado do pSK-Bluescript (Stratagene, EUA) em que um sítio de clivagem de *PacI* foi introduzido em cada flanco do sítio de clonagem múltipla (SCM).

Geração de plantas de batata transgênicas com uma expressão reduzida do gene de um gene de REI, SSIII e REII

Para gerar plantas transgênicas com uma actividade reduzida de uma proteína REI, SSIII e REII, geraram-se, numa primeira fase, plantas transgênicas com uma actividade reduzida de uma proteína REI e uma proteína SSIII. Com este fim, transferiu-se o ADN-T do plasmido pB33- α ERI- α SSIII-Kan para plantas de batata com a ajuda das agrobactérias conforme

descrito por Rocha-Sosa et al., (EMBO J. 8, (1989), 23-29). Para construir o plasmido pB33- α ERI- α SSIII-Kan (ver Fig. 7), produziu-se o vector de expressão pBin33-Kan numa primeira etapa. Com este fim, ligou-se o promotor do gene de patatina de *Solanum tuberosum* B33 (Rocha-Sosa et al., 1989, ver antes) sob a forma de um fragmento DraI (nucleótidos -1.512 - + 14) no vector pUC19 com o corte de SstI (Genbank Acc. N°. M77789), cujas extremidades se tinham tornado cegas com a ajuda da polimerase do ADN de T4. Isto deu origem ao plasmido pUC19-B33. Excisou-se o promotor de B33 do plasmido, utilizando EcoRI e SmaI e ligou-se ao vector pBinAR apropriadamente cortado. Isto deu origem ao vector de expressão da planta pBin33-Kan. O plasmido pBinAR é um derivado do plasmido do vector pBin19 (Bevan, Nucl. Acid Research 12, (1984), 8711-8721) e foi produzido por Höfgen e Willmitzer (Plant Sci. 66, (1990), 221-230). Então tornou-se cego um fragmento de HindII de 1.631 pb, que continha um ADNc parcial, que codificava a enzima ERI da batata (Kossmann et al., 1991, Mol. & Gen. Genetics 230 (1-2): 39-44) e introduziu-se no vector pBin33, que tinha sido previamente cortado com SmaI, numa orientação anti-paralela em relação ao promotor B33 (promotor do gene B33 de patatina de *Solanum tuberosum*; Rocha-Sosa et al., 1989). Ao plasmido resultante fez-se um corte de abertura utilizando BamHI. Introduziu-se um fragmento de BamHI de 1.363 pb contendo um ADNc parcial que codifica a enzima SSIII da batata (Abel et al., 1996, loc. cit.) no sítio de clivagem, novamente numa orientação anti-paralela em relação ao promotor B33.

Após a transformação, identificaram-se várias linhas de plantas transgênicas de batata em cujos tubérculos se tinha observado uma actividade marcadamente reduzida das proteínas ERI e SSIII. As plantas que resultaram desta transformação foram designadas por 038VL.

Para detectar a actividade de sintases solúveis de amido (SSIII) por meio de electroforese em gel não desnaturante, digeriram-se amostras de tecidos de tubérculos de batata em Tris-HCl 50 mM, a pH 7,6, DTT 2 mM, EDTA 2,5 mM, glicerol a 10 % e PMSF 0,4 mM. Realizou-se a electroforese numa câmara MiniProtean II (BioRAD). A concentração do monómero dos geles que tinham uma espessura de 1,5 mm, foi da ordem 7,5 % (p/v) e a Tris-glicina 25 mM a pH 8,4 actuou como um gel e os tampões de passagem. Aplicaram-se quantidades idênticas do extracto da proteína e separaram-se durante 2 horas, a 10 mA para cada gel. Os geles com actividade foram subsequentemente incubados em tricina-NaOH 50 mM a pH 8,5, acetato de potássio 25 mM, EDTA 2 mM, DTT 2 mM, ADP-glicose 1 mM, amilopectina 0,1 % (p/v) e citrato de sódio 0,5 M. Os glucanos formados foram corados com solução de Lugol. A actividade de ERI foi detectada com a ajuda de electroforese de gel não desnaturante: Para isolar as proteínas das plantas, moeu-se o material da amostra em azoto líquido utilizando um pilão e um almofariz, introduziu-se num tampão de extracção (citrato de sódio 50 mM, a pH 6,5; EDTA 1 mM, DTT 4 mM), centrifugou-se (10 minutos, 14.000 g, a 4 °C) e depois utilizou-se directamente na medição da concentração da proteína seguindo o processo de Bradford. Depois, tratou-se 5 a 20 µg do extracto da proteína total (conforme requerido) com 4x tampão de carga (glicerol a 20 %, Tris-HCl 125 mM, a pH 6,8) e aplicou-se a um gel da actividade de ER. O tampão de escoamento (TE) era composto como se segue: TE = 30,2 g Tris-base, a pH 8,0, 144 g de glicina por 1 L de H₂O. Depois de ter terminado o escoamento do gel, fez-se a incubação de cada um dos geles, durante a noite, a 37 °C, no seio de 25 mL de "tampão de fosforilase" (25 mL de citrato de sódio 1 M a pH 7,0, 0,47 g de glicose-1-fosfato, 12,5 mg de AMP, 2,5 mg de fosforilase a/b de coelho). Coraram-se os geles utilizando solução de Lugol.

Análises feitas de uma forma mais aprofundada demonstraram que os amidos isolados das linhas 038VL008 e 038VL107, nas quais ambas as proteínas ERI e SSIII estavam reduzidas, exibiram o teor de fosfato mais elevado de todos os transformantes independentes, estudados. As plantas destas linhas foram subsequentemente transformadas com o plasmido pGSV71- α ERII-basta, conforme descrito por Rocha-Sosa et al., (EMBO J. 8, (1989), 23-29). O plasmido pGSV71- α ERII-basta foi construído rastreando uma biblioteca de ADNc de batata específica de tubérculos, com um fragmento de ADN amplificado utilizando RCP-TI (Iniciador: 5'-gggggtgttggttggacta e 5'-cccttctcctcctaataccca; Stratagene ProSTARTM HF, sistema RCP-TI de tubo único) com o ARN total dos tubérculos como matriz, seguindo processos normalizados. Desta forma, isolou-se um fragmento de ADN (SEQ ID N°. 8 com, aproximadamente, 1.250 pb e depois subclonou-se no sítio de clivagem de EcoRV do vector de clonagem pSK-Pac (ver aqui antes) sob a forma de um fragmento EcoRV-SmaI e em seguida ligou-se a um vector de expressão ME5/6 numa orientação anti-paralela relativamente ao promotor na forma de um fragmento de PacI. Isto deu origem ao plasmido pGSV71- α ERII-basta (ver, Fig. 6).

As amostras do tecido do tubérculo dos transformantes independentes, foram obtidas de plantas obtidas por transformação com o plasmido pGSV71- α ERII-basta, que foram referidas como 108CF e 110CF e determinou-se o seu teor de amilose (ver, Processos). Os amidos das linhas independentes cujos tubérculos tinham o mais elevado teor de amilose foram utilizados para uma análise posterior das características do amido. Para provar que nestas plantas não apenas a actividade de uma proteína ERI e SSIII está reduzida, mas também a actividade da proteína REII está reduzida, realizou-se outra análise com a ajuda de electroforese em gel não desnaturante. A análise realizou-se seguindo o mesmo processo já utilizado

antes para a análise da redução da actividade de ERI, com a excepção do gel de poliacrilamida não desnaturante conter maltodextrina a 0,5 % (Beba, solução de maltodextrina a 15 % para recém-nascidos, Nestlé), para além da composição descrita antes. A adição de dextrina torna possível mostrar as diferentes actividades das proteínas ERI e ERII depois da incubação dos geles em "tampão de fosforilase" (25 mL de citrato de sódio 1 M a pH 7,0, 0,47 g de glicose-1-fosfato, 12,5 mg de AMP, 2,5 mg de fosforilase a/b de coelho), durante a noite, a 37 °C, seguido da coloração com uma solução de Lugol num gel.

Processo de extracção do amido da batata

Trataram-se todos os tubérculos de uma linha (4 a 5 kg) em conjunto num extractor de sumos disponível comercialmente (Multipress automático MP80, Braun). Recolheu-se o sumo do fruto contendo amido numa tina de 10 L (relação entre altura da tina : diâmetro da tina = aproximadamente 1,1) contendo 200 mL de água da torneira em conjunto com uma colher cheia (aproximadamente 3-4 g) de di-sulfureto de sódio. Em seguida, enche-se completamente a tina com água da torneira. Depois do amido ter assentado passadas 2 horas, decantou-se o sobrenadante, fez-se uma nova suspensão do amido no seio de 10 L de água da torneira e verteu-se sobre um peneiro com uma dimensão da malha da rede de 125 µm. Passadas 2 horas (o amido tinha novamente assentado no fundo da tina), decantou-se novamente o sobrenadante aquoso. Repetiu-se esta etapa de lavagem mais 3 vezes de modo que o amido foi novamente suspenso num total de 5 vezes em água da torneira fresca. Depois, secaram-se os amidos a 37 °C até se obter um teor de água de 12-17 % e homogeneizou-se utilizando um pilão e almofariz. Os amidos ficaram então disponíveis para análise.

Exemplo 2

Análise do amido de plantas com uma expressão reduzida dos genes REI, SSIII e REII

Isolou-se, de tubérculos de batata, o amido de várias linhas independentes das transformações de 108CF e 110CF descritas no exemplo 1. Em seguida, analisaram-se as propriedades físico-químicas deste amido. Os resultados da caracterização dos amidos modificados no quadro 2 (quadro 2) para um exemplo de uma selecção de certas linhas de plantas. As análises realizaram-se pelos processos descritos aqui antes. Os quadros 2, 3 e 4 que se seguem resumem os resultados das análises por ARV com base no amido de plantas naturais:

Processo analítico 1 de ARV

Quadro 2: Parâmetros da análise por ARV do amido isolado de plantas naturais (cv. Desiree), plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e de uma proteína REI (038VL008, 038VL107) e de plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e de uma proteína REI e de uma proteína REII (108CF041, 110CF003) em percentagem, com base nos dados do amido de tipo natural. A análise com ARV foi realizada conforme descrito no processo analítico 1.

	ARV Max (%)	ARV Min (%)	ARV Fin (%)	ARV Ret (%)	T ARV (%)	Tensão do gel
cv. Desiree	100	100	100	100	100	100
038VL008	158,7	69,8	72,0	79,5	73,0	55,4
108CF041	59,6	89,9	227,5	693,7	150,2	532,3
038VL107	151,1	94,3	94,0	93,0	82,2	52,2
110CF003	106,4	158,6	265,0	625,7	151,5	737,1

Processo analítico 2 por ARV

Quadro 3: Parâmetros da análise por ARV do amido isolado de plantas naturais (cv. Desiree) plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e de uma proteína REI (038VL008, 038VL107) e de plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e de uma proteína REI e de uma proteína REII (108CF041, 110CF003) em percentagem, com base nos dados do amido de tipo natural. A análise com ARV foi realizada conforme descrito no processo analítico 2.

	ARV Max (%)	ARV Min (%)	ARV Fin (%)	ARV Ret (%)	T ARV (%)	Tensão do gel
cv. Desiree	100	100	100	100	100	100
038VL008	167,1	40,4	52,6	77,6	54,2	63,0
108CF041	44,5	82,5	187,5	402,7	137,4	412,2
038VL107	152,0	76,1	81,9	93,8	76,9	51,7
110CF003	92,4	172,2	n.d.	n.d.	139,0	795,0

Processo analítico 3 por ARV

Quadro 4: Parâmetros da análise por ARV do amido isolado de plantas naturais (cv. Desiree), plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e de uma proteína REI (038VL008, 038VL107) e de plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e de uma proteína REI e de uma proteína REII (108CF041, 110CF003) em percentagem, com base nos dados do amido de tipo natural. A análise com ARV foi realizada conforme descrito no processo analítico 3.

	ARV Max (%)	ARV Min (%)	ARV Fin (%)	ARV Ret (%)	T ARV (%)	Tensão do gel
cv. Desiree	100	100	100	100	100	100
038VL008	n.d.	50,2	76,5	127,8	77,0	100,5
108CF041	74,7	291,0	n.d.	205,7	236,0	630,3
038VL107	n.d.	84,5	86,4	90,1	102,3	58,1
110CF003	89,8	259,7	n.d.	n.d.	196,6	663,9

Os quadros 5, 6 e 7 que se seguem resumem os resultados da análise por ARV. Dados não se referem ao tipo natural, mas sim às medições actuais:

Processo Analítico 1 de ARV (ver, também a Fig. 1)

Quadro 5: Parâmetros da análise por ARV do amido isolado de plantas naturais (cv. Desiree), plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e de uma proteína REI (038VL008, 038VL107) e de plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e de uma proteína REI e de uma proteína REII (108CF041, 110CF003) em URVs. A análise com ARV foi realizada conforme descrito no processo analítico 1.

	ARV Max (URV)	ARV Min (URV)	ARV Fin (URV)	ARV Ret (URV)	T ARV (URV)	Tensão do gel
cv. Desiree	255,05	162,33	210,25	47,92	4,6	25,1
038VL008	404,83	113,25	151,33	38,08	3,36	13,9
108CF041	152,08	145,92	478,33	332,42	6,91	133,6
038VL107	385,5	153	197,58	44,58	3,78	13,1
110CF003	271,5	257,42	557,25	299,83	6,97	185

Processo Analítico 2 de ARV (ver, também a Fig. 2)

Quadro 6: Parâmetros da análise por ARV do amido isolado de plantas naturais (cv. Desiree), plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e de uma proteína REI (038VL008, 038VL107) e de plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e de uma proteína REI e de uma proteína REII (108CF041, 110CF003) em URVs. A análise com ARV foi realizada conforme descrito no processo analítico 2.

	ARV Max (URV)	ARV Min (URV)	ARV Fin (URV)	ARV Ret (URV)	T ARV (URV)	Tensão do gel
cv. Desiree	212,17	113,75	169,25	55,5	28,78	23,8
038VL008	354,58	45,92	89	43,08	15,61	15
108CF041	94,33	93,83	317,33	223,5	39,53	98,1
038VL107	322,58	86,58	138,67	52,08	22,13	12,3
110CF003	196,08	195,92	n.d.	n.d.	39,99	189,2

Processo Analítico 3 de ARV (ver, também a Fig. 3)

Quadro 7: Parâmetros da análise por ARV do amido isolado de plantas naturais (cv. Desiree), plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e de uma proteína REI (038VL008, 038VL107) e de plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e de uma proteína REI e de uma proteína REII (108CF041, 110CF003) em URVs. A análise com ARV foi realizada conforme descrito no processo analítico 3.

	ARV Max (URV)	ARV Min (URV)	ARV Fin (URV)	ARV Ret (URV)	T ARV (URV)	Tensão do gel
cv. Desiree	819,67	207,67	314,25	106,58	16,88	56,5
038VL008	n.d.	104,17	240,33	136,17	12,99	56,8
108CF041	612,33	604,25	823,5	219,25	39,83	356,1
038VL107	n.d.	175,42	271,5	96,08	17,27	32,8
110CF003	736,08	539,42	n.d.	n.d.	33,18	375,1

Resumo das análises de fosfato e amilose:

Quadro 8: Teor de fosfato de amilose do amido isolado de plantas naturais (cv. Desiree), plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e uma proteína ERI (038VL008, 038VL107) e de plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e de uma proteína ERI e de uma proteína ERII (108CF041, 110CF003). Os teores de fosfato na posição C6 dos monómeros de glicose e o teor de fosfato total do amido estão indicados em percentagem com base no amido das plantas naturais; os teores de amilose estão indicados em percentagem de amilose com base na quantidade total do amido ou em percentagem com base no teor de amilose do amido de plantas naturais.

Nº.	Genótipo	Fosfato em C6 (%)	Fosfato total em (%)	Amilose (%)	Amilose (% em peso)
1	cv. Desiree	100	100	22	100
2	038VL008	346,4	255,2	19,4	85,8
3	108CF041	557,3	427,6	36,8	162,8
4	038VL107	225,5	182,8	19,7	87,2
5	110CF003	446,4	348,3	34,6	153,1

A análise da distribuição das cadeias laterais de amilopectina foi realizada como se descreveu antes. O quadro que se segue é um resumo das contribuições das áreas individuais dos picos:

Quadro 9: O quadro 9 mostra um resumo das contribuições das áreas individuais dos picos do cromatograma de HPAEC em relação à área total do pico de plantas naturais (cv. Desiree), das plantas 038VL008 e 038VL107 (plantas de batata com uma actividade reduzida de uma proteína ERI e de uma proteína SSIII) e de linhas seleccionadas das transformações 108CF e 110CF (plantas de batata com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e de uma proteína ERI e de proteína ERII). O número de monómeros de glicose das cadeias laterais individuais está indicado como gp.

Unidades de glicose	cv. Desiree	038VL008	108CF041	038VL107	110CF003
gp 6	1,52	4,16	1,88	2,39	0,86
gp 7	1,4	1,4	0,63	1,42	0,59
gp 8	1,23	0,77	0,33	0,99	0,38
gp 9	2,05	1,42	0,74	1,79	0,75
gp 10	3,55	2,8	1,74	3,33	1,77
gp 11	5,16	4,41	2,92	4,96	3,46
gp 12	6,25	5,77	4,47	6,22	5,17
gp 13	6,71	6,7	5,63	6,87	6,35
gp 14	6,75	7,06	6,35	6,99	7,38
gp 15	6,48	6,76	6,62	6,65	7,63
gp 16	6,07	5,99	6,34	6,11	7,13
gp 17	5,6	5,21	5,81	5,49	6,3
gp 18	5,28	4,78	5,87	5,11	5,98
gp 19	4,99	4,74	6,17	4,94	5,91
gp 20	4,76	4,65	6,07	4,78	5,64
gp 21	4,5	4,46	5,65	4,5	5,26
gp 22	4,16	4,12	5,07	4,2	4,7
gp 23	3,77	3,68	4,59	3,78	4,19
gp 24	3,44	3,36	4,24	3,42	3,75
gp 25	3,08	3,09	3,86	3,07	3,49
gp 26	2,73	2,8	3,36	2,77	3,03
gp 27	2,39	2,58	2,95	2,37	2,65
gp 28	2,07	2,26	2,39	2,01	2,1
gp 29	1,67	1,87	1,87	1,71	1,69

Unidades de glicose	cv. Desiree	038VL008	108CF041	038VL107	110CF003
gp 30	1,38	1,58	1,54	1,35	1,3
gp 31	1,07	1,28	1,02	1,04	0,87
gp 32	0,79	0,96	0,7	0,75	0,6
gp 33	0,57	0,69	0,6	0,51	0,51
gp 34	0,36	0,43	0,39	0,32	0,34
gp 35	0,22	0,22	0,19	0,17	0,2
Total	100	100	99,99	100,01	99,98

O comprimento da cadeia do pico, cujo valor é a média de 2 comprimentos de cadeia (dados em GP) que mais contribui para a área total sob os picos do cromatograma de HPAEC, é - no caso de amilopectina desramificada - de plantas de tipo natural com GP = 13, no caso de plantas 038VL aproximadamente com GP = 13 e no caso de plantas 108CF e 110CF, na média, em 15.

Se o comprimento da cadeia do pico das plantas transgênicas for comparado com o comprimento da cadeia do pico de amilopectina de plantas de tipo natural, resulta os valores que se seguem para a relação do comprimento das cadeias do pico (relação de CCP):

Relação CCP para 038VL = $13/13 = 1$

Relação CCP para 108/110CF = $15/13 = 1,15$

Além disso, analisou-se a morfologia dos grânulos de amido utilizando um microscópio de varrimento electrónico (MVE). A superfície dos grânulos de amido das plantas 108/110CF parece revestida ou recoberta com formação de poros.

Além disso, fez-se a determinação da dimensão dos grânulos utilizando um fotomedidor de sedimentos do tipo "Lumosed" da Retsch GmbH, Alemanha. A dimensão média dos grânulos das

amostras de amido não tratadas foi determinada (quadro 3). Dimensão média dos grânulos [μm].

Quadro 10: Valores da dimensão média dos grânulos de amido isolado de plantas de tipo natural (cv. Desiree) plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e de uma proteína REI (038VL008, 038VL107) e de plantas com uma actividade reduzida de proteína SSIII e de uma proteína ERI e de uma proteína ERII (108CF041, 110CF003).

Amostra	Dimensão média do grânulo
cv.Desiree	29,7
038VL008	21,5
108CF041	20,8
038VL107	22,9
110CF003	20,7

Exemplo 3

Análise da distribuição das cadeias laterais de amilopectina, por meio de cromatografia de permeação de gel

Para separar a amilose e a amilopectina, dissolveu-se 100 mg de amido no seio de 6 mL de DMSO (v/v) a 90 % com agitação constante. Depois da adição de 3 volumes de etanol, separou-se o precipitado por centrifugação durante 10 minutos a 1.800 g, à temperatura ambiente. Em seguida, lavaram-se os peletes com 30 mL de etanol, secaram-se e dissolveram-se no seio de 10 mL de uma solução de NaCl (p/v) a 1 %, a 60 °C. Depois de se arrefecer a solução para 30 °C, adicionou-se, lentamente, aproximadamente, 50 mg de timol e fez-se a incubação desta solução durante 2 a 3 dias, a 30 °C. Centrifugou-se então a solução durante 30 minutos a 2.000 g, à temperatura ambiente. Tratou-se então o sobrenadante com 3

volumes de etanol e a amilopectina que assentou, foi separada por centrifugação durante 5 minutos, a 2.000 g, à temperatura ambiente. Os peletes (amilopectina) são então lavados com 10 mL de etanol (v/v) a 70 %, centrifugou-se durante 10 minutos a 2.000 g, à temperatura ambiente e depois secou-se utilizando acetona. Em seguida agitou-se 10 mg de amilopectina durante 10 minutos, a 70 °C, no seio de 250 µL de DMSO (v/v) a 90 %. Adicionou-se 375 µL de água a uma temperatura de 80 °C à solução até à sua dissolução completa. Tratou-se 200 µL desta solução com 300 µL de uma solução de acetato de sódio 16,6 mM, a pH 3,5 e 2 µL de isoamilase (0,24 µ/µL, Megazyme, Sydney, Austrália) e fez-se a incubação da mistura durante 15 horas, a 37 °C. Em seguida, filtrou-se uma mistura reaccional aquosa desta isoamilase numa diluição a 1:4 com DMSO, contendo nitrato de sódio 90 mM, através de um filtro 0,2 µm e fez-se a análise de 24 µL do filtrado por meio de cromatografia. A separação foi realizada com duas colunas ligadas em série, primeiro uma Gram PSS3000 (Polymer Standards Service, com uma pré-coluna apropriada), seguida de uma Gram PSS100. A detecção foi feita por meio de um detector do índice de refração (RI 71, Shodex). Equilibrou-se a coluna com DMSO contendo nitrato de sódio 90 mM. Eluiu-se com DMSO contendo nitrato de sódio 90 mM a uma velocidade de fluxo de 0,7 mL/minuto, durante um período de 1 hora. Para correlacionar o volume de diluição com a massa molecular, utilizou-se a coluna equilibrada com padrões de dextrano. Os dextrans utilizados, a sua massa molecular e os volumes de eluição estão indicados na fig. 9. Utilizando o gráfico de calibração resultante, o diagrama de diluição foi exibido como uma distribuição de peso molecular (Fig. 10). Os cromatogramas obtidos foram depois avaliados utilizando o programa Wingpc, Versão 6 da Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Alemanha. A área total sob a linha do cromatograma de CFG, foi dividida em segmentos individuais, cada um deles

representando grupos de cadeias laterais de diferentes comprimentos. Os segmentos escolhidos continham cadeias de glucano com o seguinte grau de polimerização (GP = número de monómeros de glicose dentro de uma cadeia lateral): GP ≤ 11 GP 12-18, GP 19-24, GP 25-30, GP 31-36, GP 37-42, GP 43-48, GP 49-55, GP 56-61 e GP 62-123. Para determinar o peso molecular das cadeias laterais individuais, assumiu-se um peso molecular para a glicose de 162. A área total sob a linha no cromatograma de CFG foi então fixada em 100 % e a percentagem das áreas dos segmentos individuais foi calculada com base na percentagem da área total. Os resultados obtidos desta análise estão indicados no quadro 11.

Quadro 11: Perfis das cadeias laterais com GP 12 a 18, GP 19 a 24, GP 25 a 30, GP 31 a 36, GP 37 a 42, GP 43-48, GP 49 a 55, GP 56 a 61 e GP 62 a 123 para a amilopectina isolada de plantas de tipo natural (cv. Desiree) e de plantas com uma actividade reduzida de uma proteína SSIII e de uma proteína ERI e de uma proteína ERII (108CF041). As percentagens indicam a modificação dos perfis individuais das cadeias laterais com base na amilopectina isolada de plantas de tipo natural.

	Tipo natural	08CF041c
GP ≥ 11	100 %	40 %
GP 12-18	100 %	50 %
GP 19-24	100 %	69 %
GP 25-30	100 %	91 %
GP 31-36	100 %	111 %
GP 37-42	100 %	116 %
GP 43-48	100 %	110 %
GP 49-55	100 %	107 %
GP 56-61	100 %	109 %
GP 62-123	100 %	157 %

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Bayer CropScience GmbH

<120> Plant cells and plants which synthesize a starch with an increased final viscosity

<130> BCS 02 5002 - PCT

<150> EP 02028530.0

<151> 2002-12-19

<150> EP 03090275.3

<151> 2003-08-29

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4167

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<220>

<221> CDS

<222> (207) .. (3899)

<223>

<300>

<301> Abel, G.J., Springer, F., Willmitzer, L. and Kossmann, J.

<302> Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa

<303> Plant J.

<304> 10

<305> 6

<306> 981-991

<307> 1996

<308> X94400

<309> 1995-12-22

<313> (1)..(4167)

<300>

<308> EMBL / X94400

<309> 1997-04-16

<313> (1)..(4167)

<400> 1

ttttttaata gattttttaaa accccattaa agcaaatacg tatataattg cagcacagat
60

acagagaggg agagagaaag atagtgtgtt gatgaaggag aagagagata tttcacatgg
120

gatgttctat ttgattctgt ggtgaacaag agttttacaa agaacattcc tttttctttt
180

ttttttggtt cttgtgtggg tcagcc atg gat gtt cca ttt cca ctg cat aga
233

Met Asp Val Pro Phe Pro Leu His Arg

1

5

cca ttg agt tgc aca agt gtc tcc aat gca ata acc cac ctc aag atc
281

Pro Leu Ser Cys Thr Ser Val Ser Asn Ala Ile Thr His Leu Lys Ile

10

15

20

25

aaa cct ttt ctt ggg ttt gtc tct cat gga acc aca agt cta tca gta
329

Lys Pro Phe Leu Gly Phe Val Ser His Gly Thr Thr Ser Leu Ser Val

30

35

40

caa tct tct tca tgg agg aag gat gga atg gtt act ggg gtt tca ttt
377

Gln Ser Ser Ser Trp Arg Lys Asp Gly Met Val Thr Gly Val Ser Phe

45

50

55

cca ttt tgt gca aat ctc tcg gga aga aga cgg aga aaa gtt tca act
425

Pro Phe Cys Ala Asn Leu Ser Gly Arg Arg Arg Arg Lys Val Ser Thr

60

65

70

act agg agt caa gga tct tca cct aag ggg ttt gtg cca agg aag ccc
473

Thr Arg Ser Gln Gly Ser Ser Pro Lys Gly Phe Val Pro Arg Lys Pro

75

80

85

tca ggg atg agc acg caa aga aag gtt cag aag agc aat ggt gat aaa
521

Ser Gly Met Ser Thr Gln Arg Lys Val Gln Lys Ser Asn Gly Asp Lys

90

95

100

105

gaa agt caa agt act tca aca tct aaa gaa tct gaa att tcc aac cag
569

Glu Ser Gln Ser Thr Ser Thr Ser Lys Glu Ser Glu Ile Ser Asn Gln

110

115

120

aag acg gtt gaa gca aga gtt gaa act agt gac gat gac act aaa gta
617
Lys Thr Val Glu Ala Arg Val Glu Thr Ser Asp Asp Asp Thr Lys Val

125

130

135

gtg gtg agg gac cac aag ttt ctg gag gat gag gat gaa atc aat ggt
665
Val Val Arg Asp His Lys Phe Leu Glu Asp Glu Asp Glu Ile Asn Gly

140

145

150

tct act aaa tca ata agt atg tca cct gtt cgt gta tca tct caa ttt
713
Ser Thr Lys Ser Ile Ser Met Ser Pro Val Arg Val Ser Ser Gln Phe

155

160

165

gtt gaa agt gaa gaa act ggt ggt gat gac aag gat gct gta aag tta
761
Val Glu Ser Glu Glu Thr Gly Gly Asp Asp Lys Asp Ala Val Lys Leu

170

175

180

185

aac aaa tca aag aga tcg gaa gag agt gat ttt cta att gat tct gta
809
Asn Lys Ser Lys Arg Ser Glu Glu Ser Asp Phe Leu Ile Asp Ser Val

190

195

200

ata aga gaa caa agt gga tct cag ggg gaa act aat gcc agt agc aag
857
Ile Arg Glu Gln Ser Gly Ser Gln Gly Glu Thr Asn Ala Ser Ser Lys

205

210

215

gga agc cat gct gtg ggt aca aaa ctt tat gag ata ttg cag gtg gat
905
Gly Ser His Ala Val Gly Thr Lys Leu Tyr Glu Ile Leu Gln Val Asp

- 220

225

230

gtt gag cca caa caa ttg aaa gaa aat aat gct ggg aat gtt gaa tac

953
 Val Glu Pro Gln Gln Leu Lys Glu Asn Asn Ala Gly Asn Val Glu Tyr
 235 240 245

 aaa gga cct gta gca agt aag cta ttg gaa att act aag gct agt gat
 1001
 Lys Gly Pro Val Ala Ser Lys Leu Leu Glu Ile Thr Lys Ala Ser Asp
 250 255 260 265

 gtg gaa cac act gaa agc aat gag att gat gac tta gac act aat agt
 1049
 Val Glu His Thr Glu Ser Asn Glu Ile Asp Asp Leu Asp Thr Asn Ser
 270 275 280

 ttc ttt aaa tca gat tta att gaa gag gat gag cca tta gct gca gga
 1097
 Phe Phe Lys Ser Asp Leu Ile Glu Glu Asp Glu Pro Leu Ala Ala Gly
 285 290 295

 aca gtg gag act gga gat tct tct cta aac tta aga ttg gag atg gaa
 1145
 Thr Val Glu Thr Gly Asp Ser Ser Leu Asn Leu Arg Leu Glu Met Glu
 300 305 310

 gca aat cta cgt agg cag gct ata gaa agg ctt gcc gag gaa aat tta
 1193
 Ala Asn Leu Arg Arg Gln Ala Ile Glu Arg Leu Ala Glu Glu Asn Leu
 315 320 325

 ttg caa ggg atc aga tta ttt tgt ttt cca gag gtt gta aaa cct gat
 1241
 Leu Gln Gly Ile Arg Leu Phe Cys Phe Pro Glu Val Val Lys Pro Asp
 330 335 340 345

 gaa gat gtc gag ata ttt ctt aac aga ggt ctt tcc act ttg aag aat
 1289
 Glu Asp Val Glu Ile Phe Leu Asn Arg Gly Leu Ser Thr Leu Lys Asn

350	355	360
gag tct gat gtc ttg att atg gga gct ttt aat gag tgg cgc tat agg		
1337		
Glu Ser Asp Val Leu Ile Met Gly Ala Phe Asn Glu Trp Arg Tyr Arg		
365	370	375
tct ttt act aca agg cta act gag act cat ctc aat gga gat tgg tgg		
1385		
Ser Phe Thr Thr Arg Leu Thr Glu Thr His Leu Asn Gly Asp Trp Trp		
380	385	390
tct tgc aag atc cat gtt ccc aag gaa gca tac agg gct gat ttt gtg		
1433		
Ser Cys Lys Ile His Val Pro Lys Glu Ala Tyr Arg Ala Asp Phe Val		
395	400	405
ttt ttt aat gga caa gat gtc tat gac aac aat gat gga aat gac ttc		
1481		
Phe Phe Asn Gly Gln Asp Val Tyr Asp Asn Asn Asp Gly Asn Asp Phe		
410	415	420
425		
agt ata act gtg aaa ggt ggt atg caa atc att gac ttt gaa aat ttc		
1529		
Ser Ile Thr Val Lys Gly Gly Met Gln Ile Ile Asp Phe Glu Asn Phe		
430	435	440
ttg ctt gag gag aaa tgg aga gaa cag gag aaa ctt gct aaa gaa caa		
1577		
Leu Leu Glu Glu Lys Trp Arg Glu Gln Glu Lys Leu Ala Lys Glu Gln		
445	450	455
gct gaa aga gaa aga cta gcg gaa gaa caa aga cga ata gaa gca gag		
1625		
Ala Glu Arg Glu Arg Leu Ala Glu Glu Gln Arg Arg Ile Glu Ala Glu		
460	465	470

aaa gct gaa att gaa gct gac aga gca caa gca aag gaa gag gct gca
 1673
 Lys Ala Glu Ile Glu Ala Asp Arg Ala Gln Ala Lys Glu Glu Ala Ala

475

480

485

aag aaa aag aaa gta ttg cga gaa ttg atg gta aaa gcc acg aag act
 1721
 Lys Lys Lys Lys Val Leu Arg Glu Leu Met Val Lys Ala Thr Lys Thr

490

495

500

505

cgt gat atc acg tgg tac ata gag cca agt gaa ttt aaa tgc gag gac
 1769
 Arg Asp Ile Thr Trp Tyr Ile Glu Pro Ser Glu Phe Lys Cys Glu Asp

510

515

520

aag gtc agg tta tac tat aac aaa agt tca ggt cct ctc tcc cat gct
 1817
 Lys Val Arg Leu Tyr Tyr Asn Lys Ser Ser Gly Pro Leu Ser His Ala

525

530

535

aag gac ttg tgg atc cac gga gga tat aat aat tgg aag gat ggt ttg
 1865
 Lys Asp Leu Trp Ile His Gly Gly Tyr Asn Asn Trp Lys Asp Gly Leu

540

545

550

tct att gtc aaa aag ctt gtt aaa tct gag aga ata gat ggt gat tgg
 1913
 Ser Ile Val Lys Lys Leu Val Lys Ser Glu Arg Ile Asp Gly Asp Trp

555

560

565

tgg tat aca gag gtt gtt att cct gat cag gca ctt ttc ttg gat tgg
 1961
 Trp Tyr Thr Glu Val Val Ile Pro Asp Gln Ala Leu Phe Leu Asp Trp

570

575

580

585

gtt ttt gct gat ggt cca ccc aag cat gcc att gct tat gat aac aat
 2009
 Val Phe Ala Asp Gly Pro Pro Lys His Ala Ile Ala Tyr Asp Asn Asn

590	595	600
cac cgc caa gac ttc cat gcc att gtc ccc aac cac att ccg gag gaa		
2057		
His Arg Gln Asp Phe His Ala Ile Val Pro Asn His Ile Pro Glu Glu		
605	610	615
tta tat tgg gtt gag gaa gaa cat cag atc ttt aag aca ctt cag gag		
2105		
Leu Tyr Trp Val Glu Glu Glu His Gln Ile Phe Lys Thr Leu Gln Glu		
620	625	630
gag aga agg ctt aga gaa gcg gct atg cgt gct aag gtt gaa aaa aca		
2153		
Glu Arg Arg Leu Arg Glu Ala Ala Met Arg Ala Lys Val Glu Lys Thr		
635	640	645
gca ctt ctg aaa act gaa aca aag gaa aga act atg aaa tca ttt tta		
2201		
Ala Leu Leu Lys Thr Glu Thr Lys Glu Arg Thr Met Lys Ser Phe Leu		
650	655	660
ctg tct cag aag cat gta gta tat act gag cct ctt gat atc caa gct		
2249		
Leu Ser Gln Lys His Val Val Tyr Thr Glu Pro Leu Asp Ile Gln Ala		
670	675	680
gga agc agc gtc aca gtt tac tat aat ccc gcc aat aca gta ctt aat		
2297		
Gly Ser Ser Val Thr Val Tyr Tyr Asn Pro Ala Asn Thr Val Leu Asn		
685	690	695
ggg aaa cct gaa att tgg ttc aga tgt tca ttt aat cgc tgg act cac		
2345		
Gly Lys Pro Glu Ile Trp Phe Arg Cys Ser Phe Asn Arg Trp Thr His		
700	705	710

cgc ctg ggt cca ttg cca cct cag aaa atg tcg cct gct gaa aat ggc
2393

Arg Leu Gly Pro Leu Pro Pro Gln Lys Met Ser Pro Ala Glu Asn Gly

715

720

725

acc cat gtc aga gca act gtg aag gtt cca ttg gat gca tat atg atg
2441

Thr His Val Arg Ala Thr Val Lys Val Pro Leu Asp Ala Tyr Met Met

730

735

740

745

gat ttt gta ttt tcc gag aga gaa gat ggt ggg att ttt gac aat aag
2489

Asp Phe Val Phe Ser Glu Arg Glu Asp Gly Gly Ile Phe Asp Asn Lys

750

755

760

agc gga atg gac tat cac ata cct gtg ttt gga gga gtc gct aaa gaa
2537

Ser Gly Met Asp Tyr His Ile Pro Val Phe Gly Gly Val Ala Lys Glu

765

770

775

cct cca atg cat att gtc cat att gct gtc gaa atg gca cca att gca
2585

Pro Pro Met His Ile Val His Ile Ala Val Glu Met Ala Pro Ile Ala

780

785

790

aag gtg gga ggc ctt ggt gat gtt gtt act agt ctt tcc cgt gct gtt
2633

Lys Val Gly Gly Leu Gly Asp Val Val Thr Ser Leu Ser Arg Ala Val

795

800

805

caa gat tta aac cat aat gtg gat att atc tta cct aag tat gac tgt
2681

Gln Asp Leu Asn His Asn Val Asp Ile Ile Leu Pro Lys Tyr Asp Cys

810

815

820

825

ttg aag atg aat aat gtg aag gac ttt cgg ttt cac aaa aac tac ttt
2729

Leu Lys Met Asn Asn Val Lys Asp Phe Arg Phe His Lys Asn Tyr Phe
830 835 840

tgg ggt ggg act gaa ata aaa gta tgg ttt gga aag gtg gaa ggt ctc
2777
Trp Gly Gly Thr Glu Ile Lys Val Trp Phe Gly Lys Val Glu Gly Leu
845 850 855

tcg gtc tat ttt ttg gag cct caa aac ggg tta ttt tcg aaa ggg tgc
2825
Ser Val Tyr Phe Leu Glu Pro Gln Asn Gly Leu Phe Ser Lys Gly Cys
860 865 870

gtc tat ggt tgt agc aat gat ggt gaa cga ttt ggt ttc ttc tgt cac
2873
Val Tyr Gly Cys Ser Asn Asp Gly Glu Arg Phe Gly Phe Phe Cys His
875 880 885

ggg gct ttg gag ttt ctt ctg caa ggt gga ttt agt ccg gat atc att
2921
Ala Ala Leu Glu Phe Leu Leu Gln Gly Gly Phe Ser Pro Asp Ile Ile
890 895 900 905

cat tgc cat gat tgg tct agt gct cct gtt gct tgg ctc ttt aag gaa
2969
His Cys His Asp Trp Ser Ser Ala Pro Val Ala Trp Leu Phe Lys Glu
910 915 920

caa tat aca cac tat ggt cta agc aaa tct cgt ata gtc ttc acg ata
3017
Gln Tyr Thr His Tyr Gly Leu Ser Lys Ser Arg Ile Val Phe Thr Ile
925 930 935

cat aat ctt gaa ttt ggg gca gat ctc att ggg aga gca atg act aac
3065
His Asn Leu Glu Phe Gly Ala Asp Leu Ile Gly Arg Ala Met Thr Asn
940 945 950

gca gac aaa gct aca aca gtt tca cca act tac tca cag gag gtg tct
3113

Ala Asp Lys Ala Thr Thr Val Ser Pro Thr Tyr Ser Gln Glu Val Ser

955

960

965

gga aac cct gta att gcg cct cac ctt cac aag ttc cat ggt ata gtg
3161

Gly Asn Pro Val Ile Ala Pro His Leu His Lys Phe His Gly Ile Val

970

975

980

985

aat ggg att gac cca gat att tgg gat cct tta aac gat aag ttc att
3209

Asn Gly Ile Asp Pro Asp Ile Trp Asp Pro Leu Asn Asp Lys Phe Ile

990

995

1000

ccg att ccg tac acc tca gaa aac gtt gtt gaa ggc aaa aca gca
3254

Pro Ile Pro Tyr Thr Ser Glu Asn Val Val Glu Gly Lys Thr Ala

1005

1010

1015

gcc aag gaa gct ttg cag cga aaa ctt gga ctg aaa cag gct gac
3299

Ala Lys Glu Ala Leu Gln Arg Lys Leu Gly Leu Lys Gln Ala Asp

1020

1025

1030

ctt cct ttg gta gga att atc acc cgc tta act cac cag aaa gga
3344

Leu Pro Leu Val Gly Ile Ile Thr Arg Leu Thr His Gln Lys Gly

1035

1040

1045

atc cac ctc att aaa cat gct att tgg cgc acc ttg gaa cgg aac
3389

Ile His Leu Ile Lys His Ala Ile Trp Arg Thr Leu Glu Arg Asn

1050

1055

1060

gga cag gta gtc ttg ctt ggt tct gct cct gat cct agg gta caa

3434
 Gly Gln Val Val Leu Leu Gly Ser Ala Pro Asp Pro Arg Val Gln
 1065 1070 1075

 aac gat ttt gtt aat ttg gca aat caa ttg cac tcc aaa tat aat
 3479
 Asn Asp Phe Val Asn Leu Ala Asn Gln Leu His Ser Lys Tyr Asn
 1080 1085 1090

 gac cgc gca cga ctc tgt cta aca tat gac gag cca ctt tct cac
 3524
 Asp Arg Ala Arg Leu Cys Leu Thr Tyr Asp Glu Pro Leu Ser His
 1095 1100 1105

 ctg ata tat gct ggt gct gat ttt att cta gtt cct tca ata ttt
 3569
 Leu Ile Tyr Ala Gly Ala Asp Phe Ile Leu Val Pro Ser Ile Phe
 1110 1115 1120

 gag cca tgt gga cta aca caa ctt acc gct atg aga tat ggt tca
 3614
 Glu Pro Cys Gly Leu Thr Gln Leu Thr Ala Met Arg Tyr Gly Ser
 1125 1130 1135

 att cca gtc gtg cgt aaa act gga gga ctt tat gat act gta ttt
 3659
 Ile Pro Val Val Arg Lys Thr Gly Gly Leu Tyr Asp Thr Val Phe
 1140 1145 1150

 gat gtt gac cat gac aaa gag aga gca caa cag tgt ggt ctt gaa
 3704
 Asp Val Asp His Asp Lys Glu Arg Ala Gln Gln Cys Gly Leu Glu
 1155 1160 1165

 cca aat gga ttc agc ttt gat gga gca gat gct ggc gga gtt gat
 3749
 Pro Asn Gly Phe Ser Phe Asp Gly Ala Asp Ala Gly Gly Val Asp

1170	1175	1180
tat gct ctg aat	aga gct ctc tct gct	tgg tac gat ggt cgg gat
3794		
Tyr Ala Leu Asn	Arg Ala Leu Ser Ala	Trp Tyr Asp Gly Arg Asp
1185	1190	1195
tgg ttc aac tct	tta tgc aag cag gtc	atg gaa caa gat tgg tct
3839		
Trp Phe Asn Ser	Leu Cys Lys Gln Val	Met Glu Gln Asp Trp Ser
1200	1205	1210
tgg aac cga cct	gct ctt gat tat ttg	gag ctt tac cat gct gct
3884		
Trp Asn Arg Pro	Ala Leu Asp Tyr Leu	Glu Leu Tyr His Ala Ala
1215	1220	1225
aga aag tta gaa	tag ttagtttgtg	agatgctagc agaaaaattc acgagatctg
3939		
Arg Lys Leu Glu		
1230		
caatctgtac aggttcagtg ttgcgctctg gacagctttt ttatttccta tatcaaagta		
3999		
taaatacaagt ctacactgag atcaatagca gacagtcctc agttcatttc attttttgtg		
4059		
caacatatga aagagcttag cctctaataa tgtagtcatt gatgattatt tgttttggga		
4119		
agaaatgaga aatcaaagga tgcaaaatac tctgaaaaaa aaaaaaaa		
4167		
<210> 2		
<211> 1230		
<212> PRT		
<213> Solanum tuberosum		
<400> 2		

Met Asp Val Pro Phe Pro Leu His Arg Pro Leu Ser Cys Thr Ser Val
1 5 10 15

Ser Asn Ala Ile Thr His Leu Lys Ile Lys Pro Phe Leu Gly Phe Val
20 25 30

Ser His Gly Thr Thr Ser Leu Ser Val Gln Ser Ser Ser Trp Arg Lys
35 40 45

Asp Gly Met Val Thr Gly Val Ser Phe Pro Phe Cys Ala Asn Leu Ser
50 55 60

Gly Arg Arg Arg Arg Lys Val Ser Thr Thr Arg Ser Gln Gly Ser Ser
65 70 75 80

Pro Lys Gly Phe Val Pro Arg Lys Pro Ser Gly Met Ser Thr Gln Arg
85 90 95

Lys Val Gln Lys Ser Asn Gly Asp Lys Glu Ser Gln Ser Thr Ser Thr
100 105 110

Ser Lys Glu Ser Glu Ile Ser Asn Gln Lys Thr Val Glu Ala Arg Val
115 120 125

Glu Thr Ser Asp Asp Asp Thr Lys Val Val Val Arg Asp His Lys Phe
130 135 140

Leu Glu Asp Glu Asp Glu Ile Asn Gly Ser Thr Lys Ser Ile Ser Met
145 150 155 160

Ser Pro Val Arg Val Ser Ser Gln Phe Val Glu Ser Glu Glu Thr Gly
165 170 175

Gly Asp Asp Lys Asp Ala Val Lys Leu Asn Lys Ser Lys Arg Ser Glu
180 185 190

Glu	Ser	Asp	Phe	Leu	Ile	Asp	Ser	Val	Ile	Arg	Glu	Gln	Ser	Gly	Ser	195	200	205
Gln	Gly	Glu	Thr	Asn	Ala	Ser	Ser	Lys	Gly	Ser	His	Ala	Val	Gly	Thr	210	215	220
Lys	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Gln	Val	Asp	Val	Glu	Pro	Gln	Gln	Leu	Lys	225	230	235
Glu	Asn	Asn	Ala	Gly	Asn	Val	Glu	Tyr	Lys	Gly	Pro	Val	Ala	Ser	Lys	245	250	255
Leu	Leu	Glu	Ile	Thr	Lys	Ala	Ser	Asp	Val	Glu	His	Thr	Glu	Ser	Asn	260	265	270
Glu	Ile	Asp	Asp	Leu	Asp	Thr	Asn	Ser	Phe	Phe	Lys	Ser	Asp	Leu	Ile	275	280	285
Glu	Glu	Asp	Glu	Pro	Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Val	Glu	Thr	Gly	Asp	Ser	290	295	300
Ser	Leu	Asn	Leu	Arg	Leu	Glu	Met	Glu	Ala	Asn	Leu	Arg	Arg	Gln	Ala	305	310	315
Ile	Glu	Arg	Leu	Ala	Glu	Glu	Asn	Leu	Leu	Gln	Gly	Ile	Arg	Leu	Phe	325	330	335
Cys	Phe	Pro	Glu	Val	Val	Lys	Pro	Asp	Glu	Asp	Val	Glu	Ile	Phe	Leu	340	345	350
Asn	Arg	Gly	Leu	Ser	Thr	Leu	Lys	Asn	Glu	Ser	Asp	Val	Leu	Ile	Met	355	360	365
Gly	Ala	Phe	Asn	Glu	Trp	Arg	Tyr	Arg	Ser	Phe	Thr	Thr	Arg	Leu	Thr	370	375	380
Glu	Thr	His	Leu	Asn	Gly	Asp	Trp	Trp	Ser	Cys	Lys	Ile	His	Val	Pro	385	390	395
																400		

Lys Glu Ala Tyr Arg Ala Asp Phe Val Phe Phe Asn Gly Gln Asp Val
405 410 415

Tyr Asp Asn Asn Asp Gly Asn Asp Phe Ser Ile Thr Val Lys Gly Gly
420 425 430

Met Gln Ile Ile Asp Phe Glu Asn Phe Leu Leu Glu Glu Lys Trp Arg
435 440 445

Glu Gln Glu Lys Leu Ala Lys Glu Gln Ala Glu Arg Glu Arg Leu Ala
450 455 460

Glu Glu Gln Arg Arg Ile Glu Ala Glu Lys Ala Glu Ile Glu Ala Asp
465 470 475 480

Arg Ala Gln Ala Lys Glu Glu Ala Ala Lys Lys Lys Lys Val Leu Arg
485 490 495

Glu Leu Met Val Lys Ala Thr Lys Thr Arg Asp Ile Thr Trp Tyr Ile
500 505 510

Glu Pro Ser Glu Phe Lys Cys Glu Asp Lys Val Arg Leu Tyr Tyr Asn
515 520 525

Lys Ser Ser Gly Pro Leu Ser His Ala Lys Asp Leu Trp Ile His Gly
530 535 540

Gly Tyr Asn Asn Trp Lys Asp Gly Leu Ser Ile Val Lys Lys Leu Val
545 550 555 560

Lys Ser Glu Arg Ile Asp Gly Asp Trp Trp Tyr Thr Glu Val Val Ile
565 570 575

Pro Asp Gln Ala Leu Phe Leu Asp Trp Val Phe Ala Asp Gly Pro Pro
580 585 590

Lys His Ala Ile Ala Tyr Asp Asn Asn His Arg Gln Asp Phe His Ala
595 600 605

Ile Val Pro Asn His Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Trp Val Glu Glu Glu
 610 615 620

His Gln Ile Phe Lys Thr Leu Gln Glu Glu Arg Arg Leu Arg Glu Ala
 625 630 635 640

Ala Met Arg Ala Lys Val Glu Lys Thr Ala Leu Leu Lys Thr Glu Thr
 645 650 655

Lys Glu Arg Thr Met Lys Ser Phe Leu Leu Ser Gln Lys His Val Val
 660 665 670

Tyr Thr Glu Pro Leu Asp Ile Gln Ala Gly Ser Ser Val Thr Val Tyr
 675 680 685

Tyr Asn Pro Ala Asn Thr Val Leu Asn Gly Lys Pro Glu Ile Trp Phe
 690 695 700

Arg Cys Ser Phe Asn Arg Trp Thr His Arg Leu Gly Pro Leu Pro Pro
 705 710 715 720

Gln Lys Met Ser Pro Ala Glu Asn Gly Thr His Val Arg Ala Thr Val
 725 730 735

Lys Val Pro Leu Asp Ala Tyr Met Met Asp Phe Val Phe Ser Glu Arg
 740 745 750

Glu Asp Gly Gly Ile Phe Asp Asn Lys Ser Gly Met Asp Tyr His Ile
 755 760 765

Pro Val Phe Gly Gly Val Ala Lys Glu Pro Pro Met His Ile Val His
 770 775 780

Ile Ala Val Glu Met Ala Pro Ile Ala Lys Val Gly Gly Leu Gly Asp
 785 790 795 800

Val Val Thr Ser Leu Ser Arg Ala Val Gln Asp Leu Asn His Asn Val
 805 810 815

Asp Ile Ile Leu Pro Lys Tyr Asp Cys Leu Lys Met Asn Asn Val Lys
 820 825 830

Asp Phe Arg Phe His Lys Asn Tyr Phe Trp Gly Gly Thr Glu Ile Lys
 835 840 845

Val Trp Phe Gly Lys Val Glu Gly Leu Ser Val Tyr Phe Leu Glu Pro
 850 855 860

Gln Asn Gly Leu Phe Ser Lys Gly Cys Val Tyr Gly Cys Ser Asn Asp
 865 870 875 880

Gly Glu Arg Phe Gly Phe Phe Cys His Ala Ala Leu Glu Phe Leu Leu
 885 890 895

Gln Gly Gly Phe Ser Pro Asp Ile Ile His Cys His Asp Trp Ser Ser
 900 905 910

Ala Pro Val Ala Trp Leu Phe Lys Glu Gln Tyr Thr His Tyr Gly Leu
 915 920 925

Ser Lys Ser Arg Ile Val Phe Thr Ile His Asn Leu Glu Phe Gly Ala
 930 935 940

Asp Leu Ile Gly Arg Ala Met Thr Asn Ala Asp Lys Ala Thr Thr Val
 945 950 955 960

Ser Pro Thr Tyr Ser Gln Glu Val Ser Gly Asn Pro Val Ile Ala Pro
 965 970 975

His Leu His Lys Phe His Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Pro Asp Ile
 980 985 990

Trp Asp Pro Leu Asn Asp Lys Phe Ile Pro Ile Pro Tyr Thr Ser Glu
 995 1000 1005

Asn Val Val Glu Gly Lys Thr Ala Ala Lys Glu Ala Leu Gln Arg
 1010 1015 1020

Lys	Leu	Gly	Leu	Lys	Gln	Ala	Asp	Leu	Pro	Leu	Val	Gly	Ile	Ile
1025						1030					1035			
Thr	Arg	Leu	Thr	His	Gln	Lys	Gly	Ile	His	Leu	Ile	Lys	His	Ala
1040						1045					1050			
Ile	Trp	Arg	Thr	Leu	Glu	Arg	Asn	Gly	Gln	Val	Val	Leu	Leu	Gly
1055						1060					1065			
Ser	Ala	Pro	Asp	Pro	Arg	Val	Gln	Asn	Asp	Phe	Val	Asn	Leu	Ala
1070						1075					1080			
Asn	Gln	Leu	His	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asp	Arg	Ala	Arg	Leu	Cys	Leu
1085						1090					1095			
Thr	Tyr	Asp	Glu	Pro	Leu	Ser	His	Leu	Ile	Tyr	Ala	Gly	Ala	Asp
1100						1105					1110			
Phe	Ile	Leu	Val	Pro	Ser	Ile	Phe	Glu	Pro	Cys	Gly	Leu	Thr	Gln
1115						1120					1125			
Leu	Thr	Ala	Met	Arg	Tyr	Gly	Ser	Ile	Pro	Val	Val	Arg	Lys	Thr
1130						1135					1140			
Gly	Gly	Leu	Tyr	Asp	Thr	Val	Phe	Asp	Val	Asp	His	Asp	Lys	Glu
1145						1150					1155			
Arg	Ala	Gln	Gln	Cys	Gly	Leu	Glu	Pro	Asn	Gly	Phe	Ser	Phe	Asp
1160						1165					1170			
Gly	Ala	Asp	Ala	Gly	Gly	Val	Asp	Tyr	Ala	Leu	Asn	Arg	Ala	Leu
1175						1180					1185			
Ser	Ala	Trp	Tyr	Asp	Gly	Arg	Asp	Trp	Phe	Asn	Ser	Leu	Cys	Lys
1190						1195					1200			
Gln	Val	Met	Glu	Gln	Asp	Trp	Ser	Trp	Asn	Arg	Pro	Ala	Leu	Asp
1205						1210					1215			

Tyr Leu Glu Leu Tyr His Ala Ala Arg Lys Leu Glu
 1220 1225 1230

<210> 3
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Solanum tuberosum

<400> 3

Arg Ser Phe Thr Thr Arg Leu Thr Glu Thr His Leu Asn Gly Asp Trp
 1 5 10 15

Trp Ser Cys Lys Ile His Val Pro Lys Glu Ala Tyr Arg Ala Asp Phe
 20 25 30

Val Phe Phe Asn Gly Gln Asp Val Tyr Asp Asn Asn Asp Gly Asn Asp
 35 40 45

Phe Ser Ile Thr Val Lys Gly Gly Met Gln Ile Ile Asp
 50 55 60

<210> 4
 <211> 1641
 <212> DNA
 <213> Solanum tuberosum

<400> 4

atgaagcaca gttcagctat ttccgctggt ttgaccgatg acaattcgac aatggcacc
 60

ctagaggaag atgtcaacac tgaaaatatt ggctctctaa atttggatcc aactttggaa
 120

ccttatctag atcacttcag acacagaatg aagagatatg tggatcagaa aatgctcatt
 180

gaaaaaatatg agggacccct tgaggaattt gctcaagggtt attttaaatt tggattcaac
240

aggggaagatg gttgcatagt ctatcgtgaa tgggctcctg ctgctcagga agcagaagtt
300

attggcgatt tcaatggtag gaacggttct aaccacatga tggagaagga ccagtttgg
360

gtttggagta ttagaattcc tgatgttgac agtaagccag tcattccaca caactccaga
420

gttaagtttc gtttcaaaca tggtaatgga gtgtgggtag atcgtatccc tgcttggata
480

aagtatgcca ctgcagacgc cacaaagttt gcagcaccat atgatggtgt ctactgggac
540

ccaccacctt cagaaaggta ccacttcaaa taccctcgcc ctcccaaacc ccgagcccca
600

cgaatctacg aagcacatgt cggcatgagc agctctgagc cacgtgtaaa ttcgtatcgt
660

gagtttgcag atgatgtttt acctcggatt aaggcaaata actataatac tgtccagttg
720

atggccataa tggaacattc ttactatgga tcatttggat atcatgttac aaactttttt
780

gctgtgagca atagatatgg aaaccgagag gacctaaagt atctgataga taaagcacat
840

agcttggggt tacaggttct ggtggatgta gttcacagtc atgcaagcaa taatgtcact
900

gatggcctca atggccttga tattggccaa ggttctcaag aatcctactt tcatgctgga
960

gagcgagggt accataagtt gtgggatagc aggctgttca actatgccaa ttgggaggtt
1020

cttcgtttcc ttctttccaa cttgaggtgg tggctagaag agtataactt tgacggattt
1080

cgatttgatg gaataacttc tatgctgtat gttcatcatg gaatcaatat gggatttaca
1140

ggaaactata atgagtattt cagcgagggt acagatgttg atgctgtggt ctatttaatg
1200

ttggccaata atctgattca caagattttc ccagacgcaa ctgttattgc cgaagatggt

1260

tctgggtatgc cgggccttag cgggcctggt tctgagggag gaattgggtt tgattaccgc
1320

ctggcaatgg caatcccaga taagtggata gattatttaa agaataagaa tgatgaagat
1380

tggtccatga aggaagtaac atcgagtttg acaaatagga gatatacaga gaagtgtata
1440

gcataatgcgg agagccatga tcagtctatt gtcggtgaca agaccattgc atttctccta
1500

atgaacaaag agatgtattc tggcatgtct tgcttgacag atgcttctcc tgttgttgat
1560

gcaggaattg cgcttgacaa gatgatccat ttttttcaca atggccttgg gaggagaggg
1620

gtacctcaat ttcatgggta a
1641

<210> 5

<211> 546

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<300>

<308> Swiss Prot / P30924

<309> 1993-07-26

<400> 5

Met Lys His Ser Ser Ala Ile Ser Ala Val Leu Thr Asp Asp Asn Ser
1 5 10 15

Thr Met Ala Pro Leu Glu Glu Asp Val Asn Thr Glu Asn Ile Gly Leu
20 25 30

Leu Asn Leu Asp Pro Thr Leu Glu Pro Tyr Leu Asp His Phe Arg His
 35 40 45

Arg Met Lys Arg Tyr Val Asp Gln Lys Met Leu Ile Glu Lys Tyr Glu
 50 55 60

Gly Pro Leu Glu Glu Phe Ala Gln Gly Tyr Leu Lys Phe Gly Phe Asn
 65 70 75 80

Arg Glu Asp Gly Cys Ile Val Tyr Arg Glu Trp Ala Pro Ala Ala Gln
 85 90 95

Glu Ala Glu Val Ile Gly Asp Phe Asn Gly Arg Asn Gly Ser Asn His
 100 105 110

Met Met Glu Lys Asp Gln Phe Gly Val Trp Ser Ile Arg Ile Pro Asp
 115 120 125

Val Asp Ser Lys Pro Val Ile Pro His Asn Ser Arg Val Lys Phe Arg
 130 135 140

Phe Lys His Gly Asn Gly Val Trp Val Asp Arg Ile Pro Ala Trp Ile
 145 150 155 160

Lys Tyr Ala Thr Ala Asp Ala Thr Lys Phe Ala Ala Pro Tyr Asp Gly
 165 170 175

Val Tyr Trp Asp Pro Pro Pro Ser Glu Arg Tyr His Phe Lys Tyr Pro
 180 185 190

Arg Pro Pro Lys Pro Arg Ala Pro Arg Ile Tyr Glu Ala His Val Gly
 195 200 205

Met Ser Ser Ser Glu Pro Arg Val Asn Ser Tyr Arg Glu Phe Ala Asp
 210 215 220

Asp Val Leu Pro Arg Ile Lys Ala Asn Asn Tyr Asn Thr Val Gln Leu
 225 230 235 240

Met Ala Ile Met Glu His Ser Tyr Tyr Gly Ser Phe Gly Tyr His Val
 245 250 255

Thr Asn Phe Phe Ala Val Ser Asn Arg Tyr Gly Asn Pro Glu Asp Leu
 260 265 270

Lys Tyr Leu Ile Asp Lys Ala His Ser Leu Gly Leu Gln Val Leu Val
 275 280 285

Asp Val Val His Ser His Ala Ser Asn Asn Val Thr Asp Gly Leu Asn
 290 295 300

Gly Phe Asp Ile Gly Gln Gly Ser Gln Glu Ser Tyr Phe His Ala Gly
 305 310 315 320

Glu Arg Gly Tyr His Lys Leu Trp Asp Ser Arg Leu Phe Asn Tyr Ala
 325 330 335

Asn Trp Glu Val Leu Arg Phe Leu Leu Ser Asn Leu Arg Trp Trp Leu
 340 345 350

Glu Glu Tyr Asn Phe Asp Gly Phe Arg Phe Asp Gly Ile Thr Ser Met
 355 360 365

Leu Tyr Val His His Gly Ile Asn Met Gly Phe Thr Gly Asn Tyr Asn
 370 375 380

Glu Tyr Phe Ser Glu Ala Thr Asp Val Asp Ala Val Val Tyr Leu Met
 385 390 395 400

Leu Ala Asn Asn Leu Ile His Lys Ile Phe Pro Asp Ala Thr Val Ile
 405 410 415

Ala Glu Asp Val Ser Gly Met Pro Gly Leu Ser Arg Pro Val Ser Glu
 420 425 430

Gly Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Arg Leu Ala Met Ala Ile Pro Asp Lys
 435 440 445

Trp Ile Asp Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Asp Glu Asp Trp Ser Met Lys
450 455 460

Glu Val Thr Ser Ser Leu Thr Asn Arg Arg Tyr Thr Glu Lys Cys Ile
465 470 475 480

Ala Tyr Ala Glu Ser His Asp Gln Ser Ile Val Gly Asp Lys Thr Ile
485 490 495

Ala Phe Leu Leu Met Asn Lys Glu Met Tyr Ser Gly Met Ser Cys Leu
500 505 510

Thr Asp Ala Ser Pro Val Val Asp Ala Gly Ile Ala Leu Asp Lys Met
515 520 525

Ile His Phe Phe His Asn Gly Leu Gly Arg Arg Gly Val Pro Gln Phe
530 535 540

His Gly
545

<210> 6
<211> 2649
<212> DNA
<213> Solanum tuberosum

<300>
<308> EMBL / AJ011890
<309> 1999-04-07

<300>
<302>- Improvments in or relating to plant starch composition
<308> EMBL / A58164
<309> 1998-03-05
<310> WO 96 34968
<311> 1996-05-03
<312> 1996-11-07

<400> 6

atggtgtata cactctctgg agttcgtttt cctactgttc catcagtgtg caaatctaataat
 60
 ggattcagca gtaatgggtga tcggaggaat gctaattgtt ctgtattctt gaaaaagcac
 120
 tctctttcac ggaagatctt ggctgaaaag tcttcttaca attccgaatt ccgaccttct
 180
 acagttgcag catcggggaa agtccttgtg cctggaaccc agagtgatag ctctcatcc
 240
 tcaacagacc aatttgagtt cactgagaca tctccagaaa attccccagc atcaactgat
 300
 gtagatagtt caacaatgga acacgctagc cagattaaaa ctgagaacga tgacgttgag
 360
 ccgtcaagtg atcttacagg aagtgttgaa gagctggatt ttgcttcac actacaacta
 420
 caagaagggtg gtaaactgga ggagtctaaa acattaaata cttctgaaga gacaattatt
 480
 gatgaatctg ataggatcag agagaggggc atccctccac ctggacttgg tcagaagatt
 540
 tatgaaatag accocctttt gacaaactat cgtcaacacc ttgattacag gtattcacag
 600
 tacaagaaac tgagggaggc aattgacaag tatgaggggtg gtttggaagc cttttctcgt
 660
 ggttatgaaa aaatggggtt cactcgtagt gctacaggta tcacttaccg tgagtgggct
 720
 cttgggtgcc agtcagctgc cctcattgga gatttcaaca attgggagcg aaatgctgac
 780
 attatgactc ggaatgaatt tgggtgtctgg gagatttttc tgccaaataa tgtggatggt
 840

tctcctgcaa ttctcatgg gtccagagtg aagatacgta tggacactcc atcaggtggt
 900
 aaggattcca ttctgcttg gatcaactac tctttacagc ttctgatga aattccatat
 960
 aatggaatac attatgatcc acccgaagag gagaggtata tcttccaaca cccacggcca
 1020
 aagaaaccaa agtcgctgag aatatatgaa tctcatattg gaatgagtag tccggagcct
 1080
 aaaattaact catacgtgaa ttttagagat gaagttcttc ctgcataaa aaagcttggg
 1140
 tacaatgcmc tgcaaattat ggctattcaa gagcattctt attacgctag ttttggttat
 1200
 catgtcacia atttttttgc accaagcagc cgttttgga cgcgccacga ccttaagtct
 1260
 ttgattgata aagctcatga gctaggaatt gttggttcca tggacattgt tcacagccat
 1320
 gcatcaaata ataactttaga tggactgaac atgtttgact gcaccgatag ttgttacttt
 1380
 cactctggag ctctgtggtta tcataggatg tgggattccc gcctctttaa ctatggaaac
 1440
 tgggaggtac ttaggtatct tctctcaa at gcgagatggg ggttggatgc gttcaaattt
 1500
 gatggattta gatttgatgg tgtgacatca atgatgtata ttcaccacgg attatcggtg
 1560
 ggattcactg ggaactacga ggaatacttt ggactcgcaa ctgatgtgga tgctgttggtg
 1620
 tatctgatgc tgggtcaacga tcttattcat gggcttttcc cagatgcaat taccattggg
 1680
 gaagatgtta gcggaatgcc gacattttgt attcccgctc aagagggggg tggtggcttt
 1740
 gactatcggc tgcatatggc aattgctgat aaacggattg agttgctcaa gaaacgggat
 1800
 gaggattgga gagtgggtga tattgttcat acactgacaa atagaagatg gtcggaaaag
 1860

tgtgtttcat acgctgaaag tcatgatcaa gctctagtcg gtgataaaac tatagcattc
1920

tggctgatgg acaaggatat gtatgatttt atggctctgg atagaccgtc aacatcatta
1980

atagatcgtg ggatagcatt gcacaagatg attaggcttg taactatggg attaggagga
2040

gaaggggtacc taaatttcat gggaaatgaa ttoggccacc ctgagtggat tgatttcctt
2100

agggtgaac aacacctctc tgatggctca gtaatccccg gaaaccaatt ccgttatgat
2160

aatgcagac ggagatttga cctgggagat gcagaatatt taagataccg tgggttgcaa
2220

gaatttgacc ggcctatgca gtatcttgaa gataaatatg agtttatgac ttcagaacac
2280

cagttcatat cacgaaagga tgaaggagat aggatgattg tatttgaaaa aggaaaccta
2340

gtttttgtct ttaattttca ctggacaaaa agctattcag actatcgcat agcctgcctg
2400

aagcctggaa aatacccggt tgccttggac toagatgac cactttttgg tggcttcggg
2460

agaattgac ataatgccga atatttcacc tttgaaggat ggtatgatga tcgtcctcgt
2520

tcaattatgg tgtatgcacc ttgtaaaaca gcagtggctt atgcactagt agacaaagaa
2580

gaagaagaag aagaagaaga agaagaagaa gtagcagcag tagaagaagt agtagtagaa
2640

gaagaatga
2649

<210> 7

<211> 882

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 7

Met Val Tyr Thr Leu Ser Gly Val Arg Phe Pro Thr Val Pro Ser Val
1 5 10 15

Tyr Lys Ser Asn Gly Phe Ser Ser Asn Gly Asp Arg Arg Asn Ala Asn
20 25 30

Val Ser Val Phe Leu Lys Lys His Ser Leu Ser Arg Lys Ile Leu Ala
35 40 45

Glu Lys Ser Ser Tyr Asn Ser Glu Phe Arg Pro Ser Thr Val Ala Ala
50 55 60

Ser Gly Lys Val Leu Val Pro Gly Thr Gln Ser Asp Ser Ser Ser Ser
65 70 75 80

Ser Thr Asp Gln Phe Glu Phe Thr Glu Thr Ser Pro Glu Asn Ser Pro
85 90 95

Ala Ser Thr Asp Val Asp Ser Ser Thr Met Glu His Ala Ser Gln Ile
100 105 110

Lys Thr Glu Asn Asp Asp Val Glu Pro Ser Ser Asp Leu Thr Gly Ser
115 120 125

Val Glu Glu Leu Asp Phe Ala Ser Ser Leu Gln Leu Gln Glu Gly Gly
130 135 140

Lys Leu Glu Glu Ser Lys Thr Leu Asn Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ile
145 150 155 160

Asp Glu Ser Asp Arg Ile Arg Glu Arg Gly Ile Pro Pro Pro Gly Leu
165 170 175

Gly Gln Lys Ile Tyr Glu Ile Asp Pro Leu Leu Thr Asn Tyr Arg Gln
180 185 190

His Leu Asp Tyr Arg Tyr Ser Gln Tyr Lys Lys Leu Arg Glu Ala Ile

405	410	415
Asp Leu Lys Ser Leu Ile Asp Lys Ala His Glu Leu Gly Ile Val Val 420 425 430		
Leu Met Asp Ile Val His Ser His Ala Ser Asn Asn Thr Leu Asp Gly 435 440 445		
Leu Asn Met Phe Asp Cys Thr Asp Ser Cys Tyr Phe His Ser Gly Ala 450 455 460		
Arg Gly Tyr His Trp Met Trp Asp Ser Arg Leu Phe Asn Tyr Gly Asn 465 470 475 480		
Trp Glu Val Leu Arg Tyr Leu Leu Ser Asn Ala Arg Trp Trp Leu Asp 485 490 495		
Ala Phe Lys Phe Asp Gly Phe Arg Phe Asp Gly Val Thr Ser Met Met 500 505 510		
Tyr Ile His His Gly Leu Ser Val Gly Phe Thr Gly Asn Tyr Glu Glu 515 520 525		
Tyr Phe Gly Leu Ala Thr Asp Val Asp Ala Val Val Tyr Leu Met Leu 530 535 540		
Val Asn Asp Leu Ile His Gly Leu Phe Pro Asp Ala Ile Thr Ile Gly 545 550 555 560		
Glu Asp Val Ser Gly Met Pro Thr Phe Cys Ile Pro Val Gln Glu Gly 565 570 575		
Gly Val Gly Phe Asp Tyr Arg Leu His Met Ala Ile Ala Asp Lys Arg 580 585 590		
Ile Glu Leu Leu Lys Lys Arg Asp Glu Asp Trp Arg Val Gly Asp Ile 595 600 605		
Val His Thr Leu Thr Asn Arg Arg Trp Ser Glu Lys Cys Val Ser Tyr		

610	615	620
Ala Glu Ser His Asp Gln Ala Leu Val Gly Asp Lys Thr Ile Ala Phe 625 630 635 640		
Trp Leu Met Asp Lys Asp Met Tyr Asp Phe Met Ala Leu Asp Arg Pro 645 650 655		
Ser Thr Ser Leu Ile Asp Arg Gly Ile Ala Leu His Lys Met Ile Arg 660 665 670		
Leu Val Thr Met Gly Leu Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Asn Phe Met Gly 675 680 685		
Asn Glu Phe Gly His Pro Glu Trp Ile Asp Phe Pro Arg Ala Glu Gln 690 695 700		
His Leu Ser Asp Gly Ser Val Ile Pro Gly Asn Gln Phe Arg Tyr Asp 705 710 715 720		
Lys Cys Arg Arg Arg Phe Asp Leu Gly Asp Ala Glu Tyr Leu Arg Tyr 725 730 735		
Arg Gly Leu Gln Glu Phe Asp Arg Pro Met Gln Tyr Leu Glu Asp Lys 740 745 750		
Tyr Glu Phe Met Thr Ser Glu His Gln Phe Ile Ser Arg Lys Asp Glu 755 760 765		
Gly Asp Arg Met Ile Val Phe Glu Lys Gly Asn Leu Val Phe Val Phe 770 775 780		
Asn Phe His Trp Thr Lys Ser Tyr Ser Asp Tyr Arg Ile Ala Cys Leu 785 790 795 800		
Lys Pro Gly Lys Tyr Pro Val Ala Leu Asp Ser Asp Asp Pro Leu Phe 805 810 815		
Gly Gly Phe Gly Arg Ile Asp His Asn Ala Glu Tyr Phe Thr Phe Glu		

820

825

830

Gly Trp Tyr Asp Asp Arg Pro Arg Ser Ile Met Val Tyr Ala Pro Cys
835 840 845

Lys Thr Ala Val Val Tyr Ala Leu Val Asp Lys Glu Glu Glu Glu Glu
850 855 860

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Val Ala Ala Val Glu Glu Val Val Val Glu
865 870 875 880

Glu Glu

<210> 8

<211> 1255

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<400> 8

attttgtatt cccgttcaag atgggggtgt tggctttgac tatcggtgc atatggcaat
60

tgctgataaa tggattgagt tgctcaagaa acgggatgag gattggagag tgggtgatat
120

gtttcataca ctgacaaata gaagatgggc ggaaaagtgt gtttcatacg ctgaaagtca
180

tgatcaagct ctagtcggtg_ataaaactat agcattctgg ctgatggaca aggatatgta
240

tgattttatg gctttggata gaccgtcaac atcattaata gatcgtggga tagcattgca
300

caagatgatt aggcttgtaa ctatgggatt aggaggagaa gggtagctaa atttcatggg
360

aaatgaattc ggccaccctg agtggattga tttccctagg gctgaacaac acctctctga
420

tggctcagta attcccgga accaattcag ttatgataaa tgcagacgga gatttgacct

480

gggagatgca gaatatTTAA gataccgtgg gttgcaagaa tttgaccggg ctatgcagta
540

tcttgaagat aaatatgagt ttatgacttc agaacaccag ttcatatcac gaaaggatga
600

aggagatagg atgattgtat ttgaaaaagg aaacctagtt tttgtcttta attttcactg
660

gacaaaaagc tattcagact atcgcatagg ctgcctgaag cctggaaaat acaagggttg
720

cttggaactca gatgatccac tttttgggtgg cttcgggaga attgatcata atgccgaatg
780

tttcaccttt gaaggatggg atgatgatcg tcctcggttca attatgggtg atgcacctag
840

tagaacagca gtggtctatg cactagtaga caaagaagaa gaagaagaag aagtagcagt
900

agtagaagaa gtagtagtag aagaagaatg aacgaacttg tgatcgcgtt gaaagatttg
960

aacgctacat agagcttctt gacgtatctg gcaatattgc atcagtcttg gcggaatttc
1020

atgtgacaaa aggtttgcaa ttctttccac tattagtagt gcaacgatat acgcagagat
1080

gaagtgtga acaaacatat gtaaaatcga tgaatttatg tcgaatgctg ggacggggctt
1140

cagcagggtt tgcttagtga gttctgtaaa ttgtcatctc tttatatgta cagccaacta
1200

gaaatcaatt atgtgagacc taaaatacaa taaccataaa atggaaatag tgctg
1255

SEQUENCE LISTING

[0141]

<110> Bayer Cropscience GmbH

<120> pflanzen, die eine Stärke mit erhöhter Endviskosität synthetisieren

<130> BCS 02 5002

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4167

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<220>

<221> CDS
<222> (207)..(3899)
<223>
<300>
<301> Abel, G.J., Springer, F., Willmitzer, L. and Kossmann, J.
<302> Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa
<303> Plant J.
<304> 10
<305> 6
<306> 981-991
<307> 1996
<308> X94400
<309> 1995-12-22
<313> (1)..(4167)
<300>
<308> EMBL / X94400
<309> 1997-04-16
<313> (1)..(4167)
<400> 1

ttttttaata gattttttaaa accccatttaa agcaaatacg tatataattg cagcacagat	60
acagagagggg agagagaaaag atagtgtgtt gatgaaggag aagagagata tttcacatgg	120
gatgttctat ttgattctgt ggtgaacaag agttttacaa agaacattcc tttttctttt	180
tttcttggtt cttgtgtggg tcagcc atg gat gtt cca ttt cca ctg cat aga	233
Met Asp Val Pro Phe Pro Leu His Arg	
1 5	
cca ttg agt tgc aca agt gtc tcc aat gca ata acc cac ctc aag atc	281
Pro Leu Ser Cys Thr Ser Val Ser Asn Ala Ile Thr His Leu Lys Ile	
10 15 20 25	
aaa cct ttt ctt ggg ttt gtc tct cat gga acc aca agt cta tca gta	329
Lys Pro Phe Leu Gly Phe Val Ser His Gly Thr Thr Ser Leu Ser Val	
30 35 40	
caa tct tct tca tgg agg aag gat gga atg gtt act ggg gtt tca ttt	377
Gln Ser Ser Ser Trp Arg Lys Asp Gly Met Val Thr Gly Val Ser Phe	
45 50 55	
cca ttt tgt gca aat ctc tcg gga aga aga cgg aga aaa gtt tca act	425
Pro Phe Cys Ala Asn Leu Ser Gly Arg Arg Arg Arg Lys Val Ser Thr	
60 65 70	
act agg agt caa gga tct tca cct aag ggg ttt gtg cca agg aag ccc	473
Thr Arg Ser Gln Gly Ser Pro Lys Gly Phe Val Pro Arg Lys Pro	
75 80 85	
tca ggg atg agc acg caa aga aag gtt cag aag agc aat ggt gat aaa	521
Ser Gly Met Ser Thr Gln Arg Lys Val Gln Lys Ser Asn Gly Asp Lys	
90 95 100 105	
gaa agt caa agt act tca aca tct aaa gaa tct gaa att tcc aac cag	569
Glu Ser Gln Ser Thr Ser Thr Ser Lys Glu Ser Glu Ile Ser Asn Gln	
110 115 120	
aag acg gtt gaa gca aga gtt gaa act agt gac gat gac act aaa gta	617
Lys Thr Val Glu Ala Arg Val Glu Thr Ser Asp Asp Asp Thr Lys Val	
125 130 135	
gtg gtg agg gac cac aag ttt ctg gag gat gag gat gaa atc aat ggt	665
Val Val Arg Asp His Lys Phe Leu Glu Asp Glu Asp Glu Ile Asn Gly	
140 145 150	
tct act aaa tca ata agt atg tca cct gtt cgt gta tca tct caa ttt	713
Ser Thr Lys Ser Ile Ser Met Ser Pro Val Arg Val Ser Ser Gln Phe	
155 160 165	
gtt gaa agt gaa gaa act ggt ggt gat gac aag gat gct gta aag tta	761
Val Glu Ser Glu Glu Thr Gly Gly Asp Asp Lys Asp Ala Val Lys Leu	
170 175 180 185	
aac aaa tca aag aga tcg gaa gag agt gat ttt cta att gat tct gta	809
Asn Lys Ser Lys Arg Ser Glu Glu Ser Asp Phe Leu Ile Asp Ser Val	
190 195 200	

ata Ile	aga Arg	gaa Glu	caa Gln 205	agt Ser	gga Gly	tct Ser	cag Gln	ggg Gly 210	gaa Glu	act Thr	aat Asn	gcc Ala 215	agt Ser	agc Ser	aag Lys	857
gga Gly	agc Ser	cat His 220	gct Ala	gtg Val	ggg Gly	aca Thr	aaa Lys 225	ctt Leu	tat Tyr	gag Glu	ata Ile 230	ttg Leu	cag Gln	gtg Val	gat Asp	905
gtt Val	gag Glu 235	cca Pro	caa Gln	caa Gln	ttg Leu	aaa Lys 240	gaa Glu	aat Asn	aat Asn	gct Ala	ggg Gly 245	aat Asn	gtt Val	gaa Glu	tac Tyr	953
aaa Lys 250	gga Gly	cct Pro	gta Val	gca Ala	agt Ser 255	aag Lys	cta Leu	ttg Leu	gaa Glu	att Ile 260	act Thr	aag Lys	gct Ala	agt Ser	gat Asp 265	1001
gtg Val	gaa Glu	cac His	act Thr	gaa Glu 270	agc Ser	aat Asn	gag Glu	att Ile	gat Asp 275	gac Asp	tta Leu	gac Asp	act Thr	aat Asn 280	agt Ser	1049
ttc Phe	ttt Phe	aaa Lys	tca Ser 285	gat Asp	tta Leu	att Ile	gaa Glu	gag Glu 290	gat Asp	gag Glu	cca Pro	tta Leu	gct Ala 295	gca Ala	gga Gly	1097
aca Thr	gtg Val	gag Glu 300	act Thr	gga Gly	gat Asp	tct Ser	tct Ser 305	cta Leu	aac Asn	tta Leu	aga Arg 310	ttg Leu	gag Glu	atg Met	gaa Glu	1145
gca Ala 315	aat Asn	cta Leu	cgt Arg	agg Arg	cag Gln	gct Ala 320	ata Ile	gaa Glu	agg Arg	ctt Leu	gcc Ala 325	gag Glu	gaa Glu	aat Asn	tta Leu	1193
ttg Leu 330	caa Gln	ggg Gly	atc Ile	aga Arg	tta Leu 335	ttt Phe	tgt Cys	ttt Phe	cca Pro	gag Glu 340	gtt Val	gta Val	aaa Lys	cct Pro	gat Asp 345	1241
gaa Glu	gat Asp	gtc Val	gag Glu 350	ata Ile	ttt Phe	ctt Leu	aac Asn	aga Arg 355	ggt Gly 355	ctt Leu	tcc Ser	act Thr	ttg Leu	aag Lys 360	aat Asn	1289
gag Glu	tct Ser	gat Asp	gtc Val 365	ttg Leu	att Ile	atg Met	gga Gly	gct Ala 370	ttt Phe	aat Asn	gag Glu	tgg Trp	cgc Arg 375	tat Tyr	agg Arg	1337
tct Ser	ttt Phe	act Thr 380	aca Thr	agg Arg	cta Leu	act Thr	gag Glu 385	act Thr	cat His	ctc Leu	aat Asn	gga Gly 390	gat Asp	tgg Trp	tgg Trp	1385
tct Ser	tgc Cys 395	aag Lys	atc Ile	cat His	gtt Val	ccc Pro 400	aag Lys	gaa Glu	gca Ala	tac Tyr	agg Arg 405	gct Ala	gat Asp	ttt Phe	gtg Val	1433
ttt Phe 410	ttt Phe	aat Asn	gga Gly	caa Gln	gat Asp 415	gtc Val	tat Tyr	gac Asp	aac Asn	aat Asn 420	gat Asp	gga Gly	aat Asn	gac Asp	ttc Phe 425	1481
agt Ser	ata Ile	act Thr	gtg Val 430	aaa Lys	ggt Gly	ggt Gly	atg Met	caa Gln	atc Ile 435	att Ile	gac Asp	ttt Phe	gaa Glu	aat Asn 440	ttc Phe	1529
ttg Leu	ctt Leu	gag Glu 445	gag Glu	aaa Lys	tgg Trp	aga Arg	gaa Glu	cag Gln 450	gag Glu	aaa Lys	ctt Leu	gct Ala	aaa Lys 455	gaa Glu	caa Gln	1577
gct Ala	gaa Glu	aga Arg 460	gaa Glu	aga Arg	cta Leu	gcg Ala	gaa Glu 465	gaa Glu	caa Gln	aga Arg	cga Arg	ata Ile 470	gaa Glu	gca Ala	gag Glu	1625

aaa gct gaa att gaa gct gac aga gca caa gca aag gaa gag gct gca Lys Ala Glu Ile Glu Ala Asp Arg Ala Gln Ala Lys Glu Glu Ala Ala 475 480 485	1673
aag aaa aag aaa gta ttg cga gaa ttg atg gta aaa gcc acg aag act Lys Lys Lys Lys Val Leu Arg Glu Leu Met Val Lys Ala Thr Lys Thr 490 495 500 505	1721
cgt gat atc acg tgg tac ata gag cca agt gaa ttt aaa tgc gag gac Arg Asp Ile Thr Trp Tyr Ile Glu Pro Ser Glu Phe Lys Cys Glu Asp 510 515 520	1769
aag gtc agg tta tac tat aac aaa agt tca ggt cct ctc tcc cat gct Lys Val Arg Leu Tyr Tyr Asn Lys Ser Ser Gly Pro Leu Ser His Ala 525 530 535	1817
aag gac ttg tgg atc cac gga gga tat aat aat tgg aag gat ggt ttg Lys Asp Leu Trp Ile His Gly Gly Tyr Asn Asn Trp Lys Asp Gly Leu 540 545 550	1865
tct att gtc aaa aag ctt gtt aaa tct gag aga ata gat ggt gat tgg Ser Ile Val Lys Lys Leu Val Lys Ser Glu Arg Ile Asp Gly Asp Trp 555 560 565	1913
tgg tat aca gag gtt gtt att cct gat cag gca ctt ttc ttg gat tgg Trp Tyr Thr Glu Val Val Ile Pro Asp Gln Ala Leu Phe Leu Asp Trp 570 575 580 585	1961
gtt ttt gct gat ggt cca ccc aag cat gcc att gct tat gat aac aat Val Phe Ala Asp Gly Pro Pro Lys His Ala Ile Ala Tyr Asp Asn Asn 590 600	2009
cac cgc caa gac ttc cat gcc att gtc ccc aac cac att ccg gag gaa His Arg Gln Asp Phe His Ala Ile Val Pro Asn His Ile Pro Glu Glu 605 610 615	2057
tta tat tgg gtt gag gaa gaa cat cag atc ttt aag aca ctt cag gag Leu Tyr Trp Val Glu Glu Glu His Gln Ile Phe Lys Thr Leu Gln Glu 620 625 630	2105
gag aga agg ctt aga gaa gcg gct atg cgt gct aag gtt gaa aaa aca Glu Arg Arg Leu Arg Glu Ala Ala Met Arg Ala Lys Val Glu Lys Thr 635 640 645	2153
gca ctt ctg aaa act gaa aca aag gaa aga act atg aaa tca ttt tta Ala Leu Leu Lys Thr Glu Thr Lys Glu Arg Thr Met Lys Ser Phe Leu 650 655 660 665	2201
ctg tct cag aag cat gta gta tat act gag cct ctt gat atc caa gct Leu Ser Gln Lys His Val Val Tyr Thr Glu Pro Leu Asp Ile Gln Ala 670 675 680	2249
gga agc agc gtc aca gtt tac tat aat ccc gcc aat aca gta ctt aat Gly Ser Ser Val Thr Val Tyr Tyr Asn Pro Ala Asn Thr Val Leu Asn 685 690 695	2297
ggt aaa cct gaa att tgg ttc aga tgt tca ttt aat cgc tgg act cac Gly Lys Pro Glu Ile Trp Phe Arg Cys Ser Phe Asn Arg Trp Thr His 700 705 710	2345
cgc ctg ggt cca ttg cca cct cag aaa atg tgc cct gct gaa aat gcc Arg Leu Gly Pro Leu Pro Pro Gln Lys Met Ser Pro Ala Glu Asn Gly 715 720 725	2393
acc cat gtc aga gca act gtg aag gtt cca ttg gat gca tat atg atg Thr His Val Arg Ala Thr Val Lys Val Pro Leu Asp Ala Tyr Met Met 730 735 740 745	2441

gat ttt gta ttt tcc gag aga gaa gat ggt ggg att ttt gac aat aag Asp Phe Val Phe Ser 750 Glu Arg Glu Asp Gly Ile Phe Asp Asn Lys 760	2489
agc gga atg gac tat cac ata cct gtg ttt gga gga gtc gct aaa gaa Ser Gly Met Asp Tyr His Ile Pro Val Phe Gly Gly Val Ala Lys Glu 765 775	2537
cct cca atg cat att gtc cat att gct gtc gaa atg gca cca att gca Pro Pro Met His Ile Val His Ile 785 Ala Val Glu Met Ala Pro Ile Ala 780 790	2585
aag gtg gga ggc ctt ggt gat gtt gtt act agt ctt tcc cgt gct gtt Lys Val 795 Gly Gly Leu Gly Asp Val Val Thr Ser Leu Ser Arg Ala Val 800 805	2633
caa gat tta aac cat aat gtg gat att atc tta cct aag tat gac tgt Gln Asp Leu Asn His Asn 815 Val Asp Ile Ile Leu Pro Lys Tyr Asp Cys 810 820 825	2681
ttg aag atg aat aat gtg aag gac ttt cgg ttt cac aaa aac tac ttt Leu Lys Met Asn Asn 830 Val Lys Asp Phe Arg Phe His Lys Asn Tyr Phe 835 840	2729
tgg ggt ggg act gaa ata aaa gta tgg ttt gga aag gtg gaa ggt ctc Trp Gly Gly Thr 845 Glu Ile Lys Val Trp Phe Gly Lys Val Glu Gly Leu 850 855	2777
tcg gtc tat ttt ttg gag cct caa aac ggg tta ttt tcg aaa ggg tgc Ser Val Tyr 860 Phe Leu Glu Pro Gln Asn Gly Leu Phe Ser Lys Gly Cys 865 870	2825
gtc tat ggt tgt agc aat gat ggt gaa cga ttt ggt ttc ttc tgt cac Val Tyr 875 Gly Cys Ser Asn Asp Gly Glu Arg Phe Gly Phe Phe Cys His 880 885	2873
gcg gct ttg gag ttt ctt ctg caa ggt gga ttt agt ccg gat atc att Ala Ala Leu Glu Phe 895 Leu Leu Gln Gly Gly Phe Ser Pro Asp Ile Ile 890 900 905	2921
cat tgc cat gat tgg tct agt gct cct gtt gct tgg ctc ttt aag gaa His Cys His Asp Trp 910 Ser Ser Ala Pro Val Ala Trp Leu Phe Lys Glu 915 920	2969
caa tat aca cac tat ggt cta agc aaa tct cgt ata gtc ttc acg ata Gln Tyr Thr His Tyr 925 Gly Leu Ser Lys Ser Arg Ile Val Phe Thr Ile 930 935	3017
cat aat ctt gaa ttt ggg gca gat ctc att ggg aga gca atg act aac His Asn Leu Glu Phe 940 Gly Ala Asp Leu Ile Gly Arg Ala Met Thr Asn 945 950	3065
gca gac aaa gct aca aca gtt tca cca act tac tca cag gag gtg tct Ala Asp Lys Ala Thr 955 Val Ser Pro Thr Tyr Ser Gln Glu Val Ser 960 965	3113
gga aac cct gta att gcg cct cac ctt cac aag ttc cat ggt ata gtg Gly Asn Pro Val Ile 975 Ala Pro His Leu His Lys Phe His Gly Ile Val 970 980 985	3161
aat ggg att gac cca gat att tgg gat cct tta aac gat aag ttc att Asn Gly Ile Asp Pro 990 Asp Ile Trp Asp Pro Leu Asn Asp Lys Phe Ile 995 1000	3209
ccg att ccg tac acc tca gaa aac gtt gtt gaa ggc aaa aca gca Pro Ile Pro Tyr 1005 Thr Ser Glu Asn Val Val Glu Gly Lys Thr Ala 1010 1015	3254

gcc aag gaa gct ttg cag cga aaa ctt gga ctg aaa cag gct gac Ala Lys Glu Ala Leu Gln Arg Lys Leu Gly Leu Lys Gln Ala Asp 1020 1025 1030	3299
ctt cct ttg gta gga att atc acc cgc tta act cac cag aaa gga Leu Pro Leu Val Gly Ile Ile Thr Arg Leu Thr His Gln Lys Gly 1035 1040 1045	3344
atc cac ctc att aaa cat gct att tgg cgc acc ttg gaa cgg aac Ile His Leu Ile Lys His Ala Ile Trp Arg Thr Leu Glu Arg Asn 1050 1055 1060	3389
gga cag gta gtc ttg ctt ggt tct gct cct gat cct agg gta caa Gly Gln Val Val Leu Leu Gly Ser Ala Pro Asp Pro Arg Val Gln 1065 1070 1075	3434
aac gat ttt gtt aat ttg gca aat caa ttg cac tcc aaa tat aat Asn Asp Phe Val Asn Leu Ala Asn Gln Leu His Ser Lys Tyr Asn 1080 1085 1090	3479
gac cgc gca cga ctc tgt cta aca tat gag gag cca ctt tct cac Asp Arg Ala Arg Leu Cys Leu Thr Tyr Asp Glu Pro Leu Ser His 1095 1100 1105	3524
ctg ata tat gct ggt gct gat ttt att cta gtt cct tca ata ttt Leu Ile Tyr Ala Gly Ala Asp Phe Ile Leu Val Pro Ser Ile Phe 1110 1115 1120	3569
gag cca tgt gga cta aca caa ctt acc gct atg aga tat ggt tca Glu Pro Cys Gly Leu Thr Gln Leu Thr Ala Met Arg Tyr Gly Ser 1125 1130 1135	3614
att cca gtc gtg cgt aaa act gga gga ctt tat gat act gta ttt Ile Pro Val Val Arg Lys Thr Gly Gly Leu Tyr Asp Thr Val Phe 1140 1145 1150	3659
gat gtt gac cat gac aaa gag aga gca caa cag tgt ggt ctt gaa Asp Val Asp His Asp Lys Glu Arg Ala Gln Gln Cys Gly Leu Glu 1155 1160 1165	3704
cca aat gga ttc agc ttt gat gga gca gat gct ggc gga gtt gat Pro Asn Gly Phe Ser Phe Asp Gly Ala Asp Ala Gly Gly Val Asp 1170 1175 1180	3749
tat gct ctg aat aga gct ctc tct gct tgg tac gat ggt cgg gat Tyr Ala Leu Asn Arg Ala Leu Ser Ala Trp Tyr Asp Gly Arg Asp 1185 1190 1195	3794
tgg ttc aac tct tta tgc aag cag gtc atg gaa caa gat tgg tct Trp Phe Asn Ser Leu Cys Lys Gln Val Met Glu Gln Asp Trp Ser 1200 1205 1210	3839
tgg aac cga cct gct ctt gat tat ttg gag ctt tac cat gct gct Trp Asn Arg Pro Ala Leu Asp Tyr Leu Glu Leu Tyr His Ala Ala 1215 1220 1225	3884
aga aag tta gaa tag ttagttttgtg agatgctagc agaaaaattc acgagatctg Arg Lys Leu Glu 1230	3939
caatctgtac aggttcagt tttgcgtctg gacagctttt ttatttccta tatcaaagta	3999
taaatcaagt ctacactgag atcaatagca gacagtcctc agttcatttc attttttgtg	4059
caacatatga aagagcttag cctctaataa tgtagtcatt gatgattatt tgttttggga	4119
agaaatgaga aatcaaagga tgcaaaatac tctgaaaaaa aaaaaaaa	4167

<210> 2

<211> 1230

<212> PRT

<213> solanum tuberosum

<400> 2

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

Lys Leu Tyr Glu Ile Leu Gln Val Asp Val Glu Pro Gln Gln Leu Lys
 225 230 235 240
 Glu Asn Asn Ala Gly Asn Val Glu Tyr Lys Gly Pro Val Ala Ser Lys
 245 250 255
 Leu Leu Glu Ile Thr Lys Ala Ser Asp Val Glu His Thr Glu Ser Asn
 260 265 270
 Glu Ile Asp Asp Leu Asp Thr Asn Ser Phe Phe Lys Ser Asp Leu Ile
 275 280 285
 Glu Glu Asp Glu Pro Leu Ala Ala Gly Thr Val Glu Thr Gly Asp Ser
 290 295 300
 Ser Leu Asn Leu Arg Leu Glu Met Glu Ala Asn Leu Arg Arg Gln Ala
 305 310 315 320
 Ile Glu Arg Leu Ala Glu Glu Asn Leu Leu Gln Gly Ile Arg Leu Phe
 325 330 335
 Cys Phe Pro Glu Val Val Lys Pro Asp Glu Asp Val Glu Ile Phe Leu
 340 345 350
 Asn Arg Gly Leu Ser Thr Leu Lys Asn Glu Ser Asp Val Leu Ile Met
 355 360 365
 Gly Ala Phe Asn Glu Trp Arg Tyr Arg Ser Phe Thr Thr Arg Leu Thr
 370 375 380
 Glu Thr His Leu Asn Gly Asp Trp Trp Ser Cys Lys Ile His Val Pro
 385 390 395 400
 Lys Glu Ala Tyr Arg Ala Asp Phe Val Phe Phe Asn Gly Gln Asp Val
 405 410 415
 Tyr Asp Asn Asn Asp Gly Asn Asp Phe Ser Ile Thr Val Lys Gly Gly
 420 425 430
 Met Gln Ile Ile Asp Phe Glu Asn Phe Leu Leu Glu Glu Lys Trp Arg
 435 440 445
 Glu Gln Glu Lys Leu Ala Lys Glu Gln Ala Glu Arg Glu Arg Leu Ala
 450 455 460
 Glu Glu Gln Arg Arg Ile Glu Ala Glu Lys Ala Glu Ile Glu Ala Asp
 465 470 475 480
 Arg Ala Gln Ala Lys Glu Glu Ala Ala Lys Lys Lys Lys Val Leu Arg
 485 490 495

Glu Leu Met Val Lys Ala Thr Lys Thr Arg Asp Ile Thr Trp Tyr Ile
 500 505 510
 Glu Pro Ser Glu Phe Lys Cys Glu Asp Lys Val Arg Leu Tyr Tyr Asn
 515 520 525
 Lys Ser Ser Gly Pro Leu Ser His Ala Lys Asp Leu Trp Ile His Gly
 530 535 540
 Gly Tyr Asn Asn Trp Lys Asp Gly Leu Ser Ile Val Lys Lys Leu Val
 545 550 555 560
 Lys Ser Glu Arg Ile Asp Gly Asp Trp Trp Tyr Thr Glu Val Val Ile
 565 570 575
 Pro Asp Gln Ala Leu Phe Leu Asp Trp Val Phe Ala Asp Gly Pro Pro
 580 585 590
 Lys His Ala Ile Ala Tyr Asp Asn Asn His Arg Gln Asp Phe His Ala
 595 600 605
 Ile Val Pro Asn His Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Trp Val Glu Glu Glu
 610 615 620
 His Gln Ile Phe Lys Thr Leu Gln Glu Glu Arg Arg Leu Arg Glu Ala
 625 630 635 640
 Ala Met Arg Ala Lys Val Glu Lys Thr Ala Leu Leu Lys Thr Glu Thr
 645 650 655
 Lys Glu Arg Thr Met Lys Ser Phe Leu Leu Ser Gln Lys His Val Val
 660 665 670
 Tyr Thr Glu Pro Leu Asp Ile Gln Ala Gly Ser Ser Val Thr Val Tyr
 675 680 685
 Tyr Asn Pro Ala Asn Thr Val Leu Asn Gly Lys Pro Glu Ile Trp Phe
 690 695 700
 Arg Cys Ser Phe Asn Arg Trp Thr His Arg Leu Gly Pro Leu Pro Pro
 705 710 715 720
 Gln Lys Met Ser Pro Ala Glu Asn Gly Thr His Val Arg Ala Thr Val
 725 730 735
 Lys Val Pro Leu Asp Ala Tyr Met Met Asp Phe Val Phe Ser Glu Arg
 740 745 750
 Glu Asp Gly Gly Ile Phe Asp Asn Lys Ser Gly Met Asp Tyr His Ile
 755 760 765

Pro Val Phe Gly Gly Val Ala Lys Glu Pro Pro Met His Ile Val His
 770 775 780
 Ile Ala Val Glu Met Ala Pro Ile Ala Lys Val Gly Gly Leu Gly Asp
 785 790 795 800
 Val Val Thr Ser Leu Ser Arg Ala Val Gln Asp Leu Asn His Asn Val
 805 810 815
 Asp Ile Ile Leu Pro Lys Tyr Asp Cys Leu Lys Met Asn Asn Val Lys
 820 825 830
 Asp Phe Arg Phe His Lys Asn Tyr Phe Trp Gly Gly Thr Glu Ile Lys
 835 840 845
 Val Trp Phe Gly Lys Val Glu Gly Leu Ser Val Tyr Phe Leu Glu Pro
 850 855 860
 Gln Asn Gly Leu Phe Ser Lys Gly Cys Val Tyr Gly Cys Ser Asn Asp
 865 870 875 880
 Gly Glu Arg Phe Gly Phe Phe Cys His Ala Ala Leu Glu Phe Leu Leu
 885 890 895
 Gln Gly Gly Phe Ser Pro Asp Ile Ile His Cys His Asp Trp Ser Ser
 900 905 910
 Ala Pro Val Ala Trp Leu Phe Lys Glu Gln Tyr Thr His Tyr Gly Leu
 915 920 925
 Ser Lys Ser Arg Ile Val Phe Thr Ile His Asn Leu Glu Phe Gly Ala
 930 935 940
 Asp Leu Ile Gly Arg Ala Met Thr Asn Ala Asp Lys Ala Thr Thr Val
 945 950 955 960
 Ser Pro Thr Tyr Ser Gln Glu Val Ser Gly Asn Pro Val Ile Ala Pro
 965 970 975
 His Leu His Lys Phe His Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Pro Asp Ile
 980 985 990
 Trp Asp Pro Leu Asn Asp Lys Phe Ile Pro Ile Pro Tyr Thr Ser Glu
 995 1000 1005
 Asn Val Val Glu Gly Lys Thr Ala Ala Lys Glu Ala Leu Gln Arg
 1010 1015 1020
 Lys Leu Gly Leu Lys Gln Ala Asp Leu Pro Leu Val Gly Ile Ile
 1025 1030 1035

Thr Arg Leu Thr His Gln Lys Gly Ile His Leu Ile Lys His Ala
 1040 1045 1050
 Ile Trp Arg Thr Leu Glu Arg Asn Gly Gln Val Val Leu Leu Gly
 1055 1060 1065
 Ser Ala Pro Asp Pro Arg Val Gln Asn Asp Phe Val Asn Leu Ala
 1070 1075 1080
 Asn Gln Leu His Ser Lys Tyr Asn Asp Arg Ala Arg Leu Cys Leu
 1085 1090 1095
 Thr Tyr Asp Glu Pro Leu Ser His Leu Ile Tyr Ala Gly Ala Asp
 1100 1105 1110
 Phe Ile Leu Val Pro Ser Ile Phe Glu Pro Cys Gly Leu Thr Gln
 1115 1120 1125
 Leu Thr Ala Met Arg Tyr Gly Ser Ile Pro Val Val Arg Lys Thr
 1130 1135 1140
 Gly Gly Leu Tyr Asp Thr Val Phe Asp Val Asp His Asp Lys Glu
 1145 1150 1155
 Arg Ala Gln Gln Cys Gly Leu Glu Pro Asn Gly Phe Ser Phe Asp
 1160 1165 1170
 Gly Ala Asp Ala Gly Gly Val Asp Tyr Ala Leu Asn Arg Ala Leu
 1175 1180 1185
 Ser Ala Trp Tyr Asp Gly Arg Asp Trp Phe Asn Ser Leu Cys Lys
 1190 1195 1200
 Gln Val Met Glu Gln Asp Trp Ser Trp Asn Arg Pro Ala Leu Asp
 1205 1210 1215
 Tyr Leu Glu Leu Tyr His Ala Ala Arg Lys Leu Glu
 1220 1225 1230

<210> 3

<211> 61

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 3

Arg Ser Phe Thr Thr Arg Leu Thr Glu Thr His Leu Asn Gly Asp Trp
 1 5 10 15

Trp Ser Cys Lys Ile His Val Pro Lys Glu Ala Tyr Arg Ala Asp Phe
20 25 30

Val Phe Phe Asn Gly Gln Asp Val Tyr Asp Asn Asn Asp Gly Asn Asp
35 40 45

Phe Ser Ile Thr Val Lys Gly Gly Met Gln Ile Ile Asp
50 55 60

<210> 4

<211> 1641

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<400> 4

```

atgaagcaca gttcagctat ttccgctgtt ttgaccgatg acaattcgac aatggcacc 60
ctagaggaag atgtcaacac tgaaaatatt ggcctcctaa atttggatcc aactttggaa 120
ccttatctag atcacttcag acacagaatg aagagatatg tggatcagaa aatgctcatt 180
gaaaaatatg agggacccct tgaggaattt gctcaagggt atttaaaatt tggattcaac 240
aggggaagatg gttgcatagt ctatcgtgaa tgggctcctg ctgctcagga agcagaagtt 300
attggcgatt tcaatggtag gaacggttct aaccacatga tggagaagga ccagtttggt 360
gtttggagta ttagaattcc tgatgttgac agtaagccag tcattccaca caactccaga 420
gttaagtttc gtttcaaaca tggtaatgga gtgtgggtag atcgtatccc tgcttgata 480
aagtatgcca ctgcagacgc cacaagttt gcagcaccat atgatggtgt ctactgggac 540
ccaccacctt cagaaaggta ccacttcaaa taccctcgcc ctcccaaacc ccgagcccca 600
cgaatctacg aagcacatgt cggcatgagc agctctgagc cacgtgtaaa ttcgtatcgt 660
gagtttgtag atgatgtttt acctcggatt aaggcaaata actataatac tgtccagttg 720
atggccataa tggaacattc ttactatgga tcatttggtat atcatgttac aaactttttt 780
gctgtgagca atagatatgg aaaccggag gacctaaagt atctgataga taaagcacat 840
agcttgggtt tacaggttct ggtggatgta gttcacagtc atgcaagcaa taatgtcact 900
gatggcctca atggctttga tattggccaa ggttctcaag aatcctactt tcatgctgga 960
gagcgagggt accataagtt gtgggtagac aggctgttca actatgcaa ttgggaggtt 1020
cttcgtttcc ttctttccaa cttgagggtg tggctagaag agtataactt tgacggattt 1080
cgatttgatg gaataacttc tatgctgtat gttcatcatg gaatcaatat gggatttaca 1140
ggaaactata atgagratit cagcgaggct acagatgttg atgctgtggt ctatttaatg 1200
ttggccaata atctgattca caagattttc ccagacgcaa ctgttattgc cgaagatgtt 1260
tctggtatgc cgggccttag cgggcctgtt tctgagggag gaattgggtt tgattaccgc 1320

```

ctggcaatgg caatcccaga taagtggata gattatttaa agaataagaa tgatgaagat 1380
 tgggtccatga aggaagtaac atcgagtttg acaaataagga gatatacaga gaagtgtata 1440
 gcatatgcgg agagccatga tcagtctatt gtcgggtgaca agaccattgc atttctccta 1500
 atgaacaaag agatgtattc tggcatgtct tgcttgacag atgcttctcc tgttgttgat 1560
 gcaggaattg cgcttgacaa gatgatccat ttttttcaca atggccttgg gaggagaggg 1620
 gtacctcaat ttcatgggta a 1641

<210> 5
 <211> 546
 <212> PRT
 <213> Solanum tuberosum
 <300>
 <308> swiss Prot / P30924
 <309> 1993-07-26
 <400> 5

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

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

Ala Glu Asp Val Ser Gly Met Pro Gly Leu Ser Arg Pro Val Ser Glu
420 425 430

Gly Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Arg Leu Ala Met Ala Ile Pro Asp Lys
435 440 445

Trp Ile Asp Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Asp Glu Asp Trp Ser Met Lys
450 455 460

Glu Val Thr Ser Ser Leu Thr Asn Arg Arg Tyr Thr Glu Lys Cys Ile
465 470 475 480

Ala Tyr Ala Glu Ser His Asp Gln Ser Ile Val Gly Asp Lys Thr Ile
485 490 495

Ala Phe Leu Leu Met Asn Lys Glu Met Tyr Ser Gly Met Ser Cys Leu
500 505 510

Thr Asp Ala Ser Pro Val Val Asp Ala Gly Ile Ala Leu Asp Lys Met
515 520 525

Ile His Phe Phe His Asn Gly Leu Gly Arg Arg Gly Val Pro Gln Phe
530 535 540

His Gly
545

<210> 6
<211> 2649
<212> DNA
<213> Solanum tuberosum
<300>
<308> EMBL / AJ011890
<309> 1999-04-07
<300>
<302> Improvements in or relating to plant starch composition
<308> EMBL / A58164
<309> 1998-03-05
<310> WO 96 34968
<311> 1996-05-03
<312> 1996-11-07
<400> 6

atgggtgtata cactctcttg agttcgtttt cctactgttc catcagtgtg caaatctaata	60
ggattcagca gtaatggtga tcggaggaat gctaattgtt ctgtattctt gaaaaagcac	120
tctctttcac ggaagatctt ggctgaaaag tcttcttaca attccgaatt ccgaccttct	180
acagttgcag catcggggaa agtccttgtg cctggaaccc agagtgatag ctcctcatcc	240
tcaacagacc aatttgagtt cactgagaca tctccagaaa attccccagc atcaactgat	300
gtagatagtt caacaatgga acacgctagc cagattaaaa ctgagaacga tgacgttgag	360
ccgtcaagtg atcttacagg aagtgttgaa gagctggatt ttgcttcac actacaacta	420
caagaagggtg gtaaaactgga ggagtctaaa acattaaata cttctgaaga gacaattatt	480
gatgaatctg ataggatcag agagaggggc atccctccac ctggacttgg tcagaagatt	540
tatgaaatag accccctttt gacaaactat cgtcaacacc ttgattacag gtattcacag	600
tacaagaaac tgaggggaggc aattgacaag tatgagggtg gtttggagc cttttctcgt	660
ggttatgaaa aaatgggttt cactcgtagt gctacaggtg tcacttaccg tgagtgggct	720
cttggtgccc agtcagctgc cctcattgga gatttcaaca attgggacgc aaatgctgac	780
attatgactc ggaatgaatt tgggtgtctg gagatttttc tgccaaataa tgtggatggt	840
tctcctgcaa ttcctcatgg gtccagagtg aagatacgtg tggacactcc atcagggtgt	900
aaggattcca ttcctgcttg gatcaactac tctttacagc ttcctgatga aattccatat	960
aatggaatac attatgatcc acccgaagag gagagggtata tcttccaaca cccacggcca	1020
aagaaaccaa agtcgctgag aatatatgaa tctcatattg gaatgagtag tccggagcct	1080
aaaattaact catacgtgaa ttttagagat gaagttcttc ctgcataaa aaagcttggg	1140
tacaatgcgc tgcaaattat ggctattcaa gagcattctt attacgctag ttttggttat	1200
catgtcacia atttttttgc accaagcagc cgttttggaa cggccgacga ccttaagtct	1260
ttgattgata aagctcatga gctaggaatt gttgttctca tggacattgt tcacagccat	1320
gcatcaaata atacttttaga tggactgaac atgtttgact gcaccgatag ttgttacttt	1380
cactctggag ctctgtggtt tcattggatg tgggattccc gcctctttaa ctatggaaac	1440
tgggagggtac ttaggtatct tctctcaaat gcgagatggt ggttggatgc gttcaaattt	1500
gatggattta gatttgatgg tgtgacatca atgatgtata ttcaccacgg attatcgggtg	1560
ggattcactg ggaactacga ggaatacttt ggactcgcaa ctgatgtgga tgctgttgtg	1620
tatctgatgc tggtaacga tcttattcat gggcttttcc cagatgcaat taccattggt	1680
gaagatgtta gcggaatgcc gacattttgt attcccgtcc aagagggggg tgttggcttt	1740
gactatcggc tgcatatggc aattgctgat aaacggattg agttgctcaa gaaacgggat	1800
gaggattgga gagtgggtga tattgttcat aactgacaa atagaagatg gtcggaaaag	1860
tgtgtttcat acgctgaaag tcatgatcaa gctctagtcg gtgataaaac tatagcattc	1920

tggtgatgg acaaggatat gtatgatttt atggctctgg atagaccgtc aacatcatta	1980
atagatcgtg ggatagcatt gcacaagatg attaggcttg taactatggg attaggagga	2040
gaagggatacc taaatttcat gggaaatgaa ttcggccacc ctgagtggat tgatttcctt	2100
agggtgaac aacacctctc tgatggctca gtaatccccg gaaaccaatt ccgttatgat	2160
aaatgcagac ggagatttga cctgggagat gcagaatatt taagataccg tgggttgcaa	2220
gaatttgacc ggcctatgca gtatcttgaa gataaatatg agtttatgac ttcagaacac	2280
cagttcatat cacgaaagga tgaaggagat aggatgattg tatttgaaaa aggaaaccta	2340
gtttttgtct ttaattttca ctggacaaaa agctattcag actatcgcac agcctgcctg	2400
aagcctggaa aatacccggt tgccttggac tcagatgatc cactttttgg tggcttcggg	2460
agaattgatc ataatgccga atatttcacc tttgaaggat ggtatgatga tcgtcctcgt	2520
tcaattatgg tgtatgcacc ttgtaaaaca gcagtggctt atgcactagt agacaaagaa	2580
gaagaagaag aagaagaaga agaagaagaa gtagcagcag tagaagaagt agtagtagaa	2640
gaagaatga	2649

<210> 7
 <211> 882
 <212> PRT
 <213> Solanum tuberosum
 <400> 7

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

Lys Thr Glu Asn Asp Asp Val Glu Pro Ser Ser Asp Leu Thr Gly Ser
 115 120 125
 Val Glu Glu Leu Asp Phe Ala Ser Ser Leu Gln Leu Gln Glu Gly Gly
 130 135 140
 Lys Leu Glu Glu Ser Lys Thr Leu Asn Thr Ser Glu Glu Thr Ile Ile
 145 150 155 160
 Asp Glu Ser Asp Arg Ile Arg Glu Arg Gly Ile Pro Pro Pro Gly Leu
 165 170 175
 Gly Gln Lys Ile Tyr Glu Ile Asp Pro Leu Leu Thr Asn Tyr Arg Gln
 180 185 190
 His Leu Asp Tyr Arg Tyr Ser Gln Tyr Lys Lys Leu Arg Glu Ala Ile
 195 200 205
 Asp Lys Tyr Glu Gly Gly Leu Glu Ala Phe Ser Arg Gly Tyr Glu Lys
 210 215 220
 Met Gly Phe Thr Arg Ser Ala Thr Gly Ile Thr Tyr Arg Glu Trp Ala
 225 230 235 240
 Leu Gly Ala Gln Ser Ala Ala Leu Ile Gly Asp Phe Asn Asn Trp Asp
 245 250 255
 Ala Asn Ala Asp Ile Met Thr Arg Asn Glu Phe Gly Val Trp Glu Ile
 260 265 270
 Phe Leu Pro Asn Asn Val Asp Gly Ser Pro Ala Ile Pro His Gly Ser
 275 280 285
 Arg Val Lys Ile Arg Met Asp Thr Pro Ser Gly Val Lys Asp Ser Ile
 290 295 300
 Pro Ala Trp Ile Asn Tyr Ser Leu Gln Leu Pro Asp Glu Ile Pro Tyr
 305 310 315 320
 Asn Gly Ile His Tyr Asp Pro Pro Glu Glu Glu Arg Tyr Ile Phe Gln
 325 330 335
 His Pro Arg Pro Lys Lys Pro Lys Ser Leu Arg Ile Tyr Glu Ser His
 340 345 350
 Ile Gly Met Ser Ser Pro Glu Pro Lys Ile Asn Ser Tyr Val Asn Phe
 355 360 365
 Arg Asp Glu Val Leu Pro Arg Ile Lys Lys Leu Gly Tyr Asn Ala Leu
 370 375 380

Gln Ile Met Ala Ile Gln Glu His Ser Tyr Tyr Ala Ser Phe Gly Tyr
 385 390 395 400
 His Val Thr Asn Phe Phe Ala Pro Ser Ser Arg Phe Gly Thr Pro Asp
 405 410 415
 Asp Leu Lys Ser Leu Ile Asp Lys Ala His Glu Leu Gly Ile Val Val
 420 425 430
 Leu Met Asp Ile Val His Ser His Ala Ser Asn Asn Thr Leu Asp Gly
 435 440 445
 Leu Asn Met Phe Asp Cys Thr Asp Ser Cys Tyr Phe His Ser Gly Ala
 450 455 460
 Arg Gly Tyr His Trp Met Trp Asp Ser Arg Leu Phe Asn Tyr Gly Asn
 465 470 475 480
 Trp Glu Val Leu Arg Tyr Leu Leu Ser Asn Ala Arg Trp Trp Leu Asp
 485 490 495
 Ala Phe Lys Phe Asp Gly Phe Arg Phe Asp Gly Val Thr Ser Met Met
 500 505 510
 Tyr Ile His His Gly Leu Ser Val Gly Phe Thr Gly Asn Tyr Glu Glu
 515 520 525
 Tyr Phe Gly Leu Ala Thr Asp Val Asp Ala Val Val Tyr Leu Met Leu
 530 535 540
 Val Asn Asp Leu Ile His Gly Leu Phe Pro Asp Ala Ile Thr Ile Gly
 545 550 555 560
 Glu Asp Val Ser Gly Met Pro Thr Phe Cys Ile Pro Val Gln Glu Gly
 565 570 575
 Gly Val Gly Phe Asp Tyr Arg Leu His Met Ala Ile Ala Asp Lys Arg
 580 585 590
 Ile Glu Leu Leu Lys Lys Arg Asp Glu Asp Trp Arg Val Gly Asp Ile
 595 600 605
 Val His Thr Leu Thr Asn Arg Arg Trp Ser Glu Lys Cys Val Ser Tyr
 610 615 620
 Ala Glu Ser His Asp Gln Ala Leu Val Gly Asp Lys Thr Ile Ala Phe
 625 630 635 640
 Trp Leu Met Asp Lys Asp Met Tyr Asp Phe Met Ala Leu Asp Arg Pro
 645 650 655

Ser Thr Ser Leu Ile Asp Arg Gly Ile Ala Leu His Lys Met Ile Arg
 660 665 670
 Leu Val Thr Met Gly Leu Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Asn Phe Met Gly
 675 680 685
 Asn Glu Phe Gly His Pro Glu Trp Ile Asp Phe Pro Arg Ala Glu Gln
 690 695 700
 His Leu Ser Asp Gly Ser Val Ile Pro Gly Asn Gln Phe Arg Tyr Asp
 705 710 715 720
 Lys Cys Arg Arg Arg Phe Asp Leu Gly Asp Ala Glu Tyr Leu Arg Tyr
 725 730 735
 Arg Gly Leu Gln Glu Phe Asp Arg Pro Met Gln Tyr Leu Glu Asp Lys
 740 745 750
 Tyr Glu Phe Met Thr Ser Glu His Gln Phe Ile Ser Arg Lys Asp Glu
 755 760 765
 Gly Asp Arg Met Ile Val Phe Glu Lys Gly Asn Leu Val Phe Val Phe
 770 775 780
 Asn Phe His Trp Thr Lys Ser Tyr Ser Asp Tyr Arg Ile Ala Cys Leu
 785 790 795 800
 Lys Pro Gly Lys Tyr Pro Val Ala Leu Asp Ser Asp Asp Pro Leu Phe
 805 810 815
 Gly Gly Phe Gly Arg Ile Asp His Asn Ala Glu Tyr Phe Thr Phe Glu
 820 825 830
 Gly Trp Tyr Asp Asp Arg Pro Arg Ser Ile Met Val Tyr Ala Pro Cys
 835 840 845
 Lys Thr Ala Val Val Tyr Ala Leu Val Asp Lys Glu Glu Glu Glu Glu
 850 855 860
 Glu Glu Glu Glu Glu Glu Val Ala Ala Val Glu Glu Val Val Val Glu
 865 870 875 880

Glu Glu
 <210> 8
 <211> 1255
 <212> DNA
 <213> Solanum tuberosum
 <400> 8

atattgtatt cccgttcaag atgggggtgt tggctttgac tatcggctgc atatggcaat	60
tgctgataaa tggattgagt tgctcaagaa acgggatgag gattggagag tgggtgatat	120
tgttcataca ctgacaaata gaagatgggc ggaaaagtgt gtttcatacg ctgaaagtca	180
tgatcaagct ctagtcggtg ataaaaactat agcattctgg ctgatggaca aggatatgta	240
tgattttatg gctttggata gaccgtcaac atcattaata gatcgtggga tagcattgca	300
caagatgatt aggcttgtaa ctatgggatt aggaggagaa gggtagctaa atttcattggg	360
aaatgaattc ggccaccctg agtggattga tttccctagg gctgaacaac acctctctga	420
tggctcagta attcccggaa accaattcag ttatgataaa tgcagacgga gatttgacct	480
gggagatgca gaatatttaa gataccgtgg gttgcaagaa tttgaccggg ctatgcagta	540
tcttgaagat aaatatgagt ttatgacttc agaacaccag ttcatatcac gaaaggatga	600
aggagatagg atgattgtat ttgaaaaagg aaacctagtt tttgtcttta attttactg	660
gacaaaaagc tattcagact atcgcatagg ctgcctgaag cctggaaaat acaagggtgc	720
cttggactca gatgatccac tttttggtgg cttcgggaga attgatcata atgccgaatg	780
tttcaccttt gaaggatggt atgatgatcg tcctcgttca attatggtgt atgcacctag	840
tagaacagca gtggtctatg cactagtaga caaagaagaa gaagaagaag aagtagcagt	900
agtagaagaa gtagtagtag aagaagaatg aacgaacttg tgatcgcggt gaaagatttg	960
aacgctacat agagcttctt gacgtatctg gcaatattgc atcagtcttg gcggaatttc	1020
atgtgacaaa aggtttgcaa ttctttccac tattagtagt gcaacgatat acgcagagat	1080
gaagtgctga acaaacatat gtaaaatcga tgaatttatg tcgaatgctg ggacgggctt	1140
cagcaggttt tgcttagtga gttctgtaaa ttgtcatctc tttatatgta cagccaacta	1200
gaaatcaatt atgtgagacc taaaatacaa taaccataaa atggaaatag tgctg	1255

Lisboa, 6 de Outubro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Célula de planta geneticamente modificada, caracterizada pelo facto de a modificação genética levar à redução da actividade de uma ou mais proteínas SSIII que ocorre endogenamente na célula da planta e à redução da actividade de uma ou mais das proteínas REI que ocorre endogenamente na célula da planta e à redução da actividade de uma ou mais das proteínas REII que ocorre endogenamente na célula da planta, em comparação com as células de plantas correspondentes, originárias de plantas do tipo natural, que não tenham sido geneticamente modificadas, em que as células das plantas geneticamente modificadas sintetizam um amido modificado que, após gelificação de uma suspensão a 6 % em água, forma um gel, com uma força do gel que está aumentada de, pelo menos, 300 % em comparação com a força do gel do amido extraído de células de plantas correspondentes, de plantas do tipo natural, que não tenham sido geneticamente modificadas.
2. Célula de planta, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo facto de a modificação genética ser a introdução de uma ou mais moléculas estranhas de ácidos nucleicos cuja a presença e/ou expressão levam à redução da actividade de uma ou mais das proteínas SSIII e REI e REII, que ocorrem na célula da planta em comparação com as células de plantas correspondentes, de plantas do tipo natural que não tenham sido modificadas geneticamente.
3. Planta contendo elementos de células de plantas, de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2.

4. Processo para gerar uma planta geneticamente modificada, caracterizado pelo facto de

- a) gerar-se uma célula de planta que sintetiza um amido modificado, amido esse que após gelificação de uma suspensão a 6 % em água forma um gel com uma força de gel que está aumentada de, pelo menos, 300 % em comparação com a força do gel de amido extraído das correspondentes células de plantas, de plantas de tipo natural, que não tenham sido geneticamente modificadas, compreendendo a modificação genética da célula da planta, levando essa modificação genética à redução da actividade de uma ou mais das proteínas SSIII que ocorre endogenamente na célula da planta e à redução da actividade de uma ou mais proteínas ERI que ocorre endogenamente na célula da planta e à redução da actividade de uma ou mais proteínas ERII que ocorre endogenamente na célula da planta, em comparação com as células das plantas correspondentes, de plantas de tipo natural, que não tenham sido geneticamente modificadas;
- b) se regenerar uma planta a partir de, ou utilizando a célula da planta gerada de acordo com a alínea a); e
- c) se for apropriado, ainda as plantas são geradas a partir de plantas geradas de acordo com a etapa da alínea b).

5. Processo para gerar uma planta transgénica, de acordo com a reivindicação 4, que sintetiza um amido modificado, caracterizado pelo facto de

- a) a célula da planta ser geneticamente modificada pela introdução de uma ou mais moléculas estranhas de ácidos nucleicos, cuja presença e/ou expressão leva à redução da actividade de, em cada caso, pelo menos uma proteína SSIII, ERI e ERII, em comparação com as correspondentes células das plantas de tipo natural, que não tenham sido geneticamente modificadas;
 - b) se regenerar uma planta partir de, ou utilizando a célula da planta gerada de acordo com a alínea a); e
 - c) se for apropriado, ainda as plantas são geradas a partir de plantas geradas de acordo com a etapa da alínea b).
- 6. Planta de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo facto de ser uma planta que armazena amido.
 - 7. Planta de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo facto de ser uma planta de batata.
 - 8. Material de propagação de plantas de acordo com uma qualquer das reivindicações 3, 6 ou 7, caracterizado pelo facto de conter pelo menos uma célula de planta de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2.
 - 9. Utilização de uma ou mais moléculas de ácidos nucleicos que codificam proteínas com a actividade enzimática de pelo menos uma proteína SSIII, pelo menos uma proteína REI e pelo menos uma proteína ERII ou os seus fragmentos, caracterizada por se destinar à geração de

- células de plantas de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2 ou plantas de acordo com uma das reivindicações 3 ou 6 a 7.
10. Amido, caracterizado pelo facto de poder ser obtido a partir de células de plantas de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2 ou a partir de uma planta de acordo com uma das reivindicações 3, 6 ou 7 ou a partir de material de propagação de acordo com a reivindicação 8.
 11. Amido de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo facto de ser um amido de batata.
 12. Processo para a produção de um amido de acordo com uma das reivindicações 10 ou 11, caracterizado pelo facto de compreender a extracção do amido de uma planta de acordo com uma das reivindicações 3, 6 ou 7 e/ou de partes dessas plantas que armazenam amido e/ou de uma célula de planta de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2 e/ou do material de propagação de acordo com a reivindicação 8.
 13. Amido de acordo com uma das reivindicações 10 ou 11, caracterizado pelo facto de se obter por um processo de acordo com a reivindicação 12.
 14. Processo para a modificação do amido de uma planta, caracterizado pelo facto de compreender o processo para gerar uma planta de acordo com uma das reivindicações 3, 6 ou 7 e se obter amido a partir da planta ou das partes da planta que contêm amido.

Lisboa, 6 de Outubro de 2008