



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

(21) **PI0708694-6 A2**



* B R P I 0 7 0 8 6 9 4 A 2 *

(22) Data de Depósito: 07/03/2007
(43) Data da Publicação: 07/06/2011
(RPI 2109)

(51) *Int.Cl.:*
C12N 9/26 2006.01
C12N 15/82 2006.01

(54) Título: **MÉTODOS PARA AUMENTAR A PROPORÇÃO DE BROTO PARA RAIZ, A PRODUÇÃO DE SEMENTES E A RESISTÊNCIA A DOENÇAS**

(57) Resumo: MÉTODOS PARA AUMENTAR A PROPORÇÃO DE BROTO PARA RAIZ, A PRODUÇÃO DE SEMENTES E A RESISTÊNCIA A DOENÇAS. A presente invenção refere-se a um método para aumentar a proporção de broto para raiz de uma planta compreendendo a etapa de inibir a atividade de uma invertase no tecido da raiz da referida planta.

(30) Prioridade Unionista: 07/03/2006 EP 06 004640.6

(73) Titular(es): Julius-Maximilians-Universität Würzburg

(72) Inventor(es): Maria de La Cruz Gonzalez Garcia, Thomas Roitsch

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

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007001964 de 07/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/101678 de 13/09/2007

| | Cloning | AtcwINV1 | AtcwINV2 | | AtcwINV3 | | AtcwINV4 | AtcwINV5 | AtcwINV6 |
|---------|---------|---------------------|---------------------|----------|----------|---------------------|---------------|---------------|--------------------|
| | | At3g13790 pi=9.5 | At3g52600 pi=8.7 | subgroup | | At1g55120 pi=5.5 | At2g3619 0 | At3g1378 4 | At5g1920 pi=4.8 |
| | | | 1 | 2 | 1 | 2 | pi=8.1 | pi=9.3 | |
| RE | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| genomic | (X) | 069 | - | - | A1 | - | - | - | - |
| DNA | I50 | | | | G2 | | | | |
| | J70 | | | | P11 | | | | |
| | Q48 | | | | | | | | |
| | R3 | | | | | | | | |
| | T60 | | | | | | | | |
| RT | - | | RT1 | - | - | RT2 | - | - | - |
| | | | RT3 | | | | | | |
| | | | RT36 | | | | | | |
| | | | RT37 | | | | | | |
| Genomic | 410_18 | | 410_17 | - | 410_49 | 110_51 | - | - | - |
| DNA | 410_30 | | 110_19 | | 410_52 | | | | |

(X) = little homology, pi 5.4
RT means reverse transcribed RNA, isolated from the anthers



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODOS PARA AUMENTAR A PROPORÇÃO DE BROTO PARA RAIZ, A PRODUÇÃO DE SEMENTES E A RESISTÊNCIA A DOENÇAS**".

5 A presente invenção refere-se a métodos para aumentar a proporção de broto para raiz, produção de sementes e resistência a doenças.

Além disso a presente invenção se refere a novas invertases e ao uso das mesmas.

10 A proporção de broto para raiz, a produção de sementes e a resistência a patógenos em plantas são particularmente ligadas ao metabolismo dos carboidratos. Mais especificamente, em plantas superiores, o crescimento e o metabolismo de tecidos enterrados (*sink tissues*) é sustentado pelos carboidratos sintetizados em folhas fonte e transportados, essencialmente sob a forma de sacarose, através do floema para dentro dos tecidos enterrados. Foi demonstrado que as relações fonte-enterrado se alteram com o crescimento e o desenvolvimento das plantas e em resposta a diferentes stresses bióticos e abióticos. De fato, a aquisição de carbono fixado do broto pelas raízes parece ser determinada tanto pela disponibilidade de, quanto pela necessidade de, assimilados no broto e raiz respectivamente (Farrar e Jones, 2000). O uso de sacarose nos tecidos enterrados requer clivagem da ligação glicosídica, catalisada tanto por sacarose sintase quanto invertases. A sacarose sintase cliva a sacarose em UDP-glucose e frutose, ao passo que a invertases hidrolisa sacarose nos monômeros de hexose. Três tipos de isoenzimas invertase são diferenciadas com base na solubilidade, localização sub-celular, pH ótimo e ponto isoelétrico (Roitsch e González, 2004). Entre estas, foi demonstrado que invertases ligadas à parede celular têm uma função crucial no particionamento dos carboidratos e suprimento de fotoassimilados para tecidos enterrados (Tang et al., 1999; Goetz et al., 2001; Weschke et al., 2003). A clivagem de sacarose no sítio de descarregamento de floema e o transporte das hexoses geradas para dentro das células enterradas, através da ação combinada de invertases da parede celular e transportadores de hexose, produz diferenças na pressão osmótica que dirige o transporte de sacarose no floema. Um descarregamento apo

15

20

25

30

plásmico de sacarose é não somente característica de tecidos simplásmica-
mente isolados mas também de tecidos ativamente em crescimento, como
pontas da raiz primária de milho, onde a demanda de fotoassimilados não
pode ser satisfeita somente pelo descarregamento simplásmico (Bret-Harte
5 e Silk, 1994). A alta atividade de invertase reportada em pontas de raiz e
sítio de emergência de raízes secundárias corrobora uma função da invertase
da parede celular no crescimento ativo deste tecido enterrado (Eschrich,
1980). Em *Arabidopsis thaliana*, o padrão de expressão de invertases da
parede celular e vacuolares na raiz durante o desenvolvimento e em respos-
10 ta a diferentes condições de cultura sugere que a invertase da parede celular
está envolvida no particionamento da sacarose em condições com algumas
altas demandas assimiladas neste tecido. Em raízes maduras, no entanto, a
expressão de invertase da parede celular não é detectada e a expressão de
invertase vacuolar seria responsável pela entrada de sacarose (Tymowska-
15 Lalanne e Kreis, 1998). O descarregamento de floema em raízes maduras
então se adequaria ao modelo proposto por Sturm et al. (1995), onde a força
propulsora para descarregamento de sacarose resulta da clivagem do açú-
car por sacarose sintase e invertase vacuolar no citosol. Em raízes de *carrot*
tap, o efeito da inibição anti-sentido de invertases vacuolares e da parede
20 celular sobre o fenótipo da planta sugere um papel importante no particio-
namento da sacarose (Tang et al., 1999). Além disso, a invertase vacuolar
pode ser um regulador chave da expansão celular, devido ao duplo potencial
osmótico gerado por clivagem de sacarose no vacúolo.

Dada esta interação altamente complexa de elementos do me-
25 tabolismo de carboidratos vegetais, o problema subjacente à presente in-
venção é identificar métodos para aumentar a proporção de broto para raiz,
a produção de sementes e a resistência a doenças em plantas.

O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um
primeiro aspecto por um método para aumentar a proporção de broto para
30 raiz de uma planta compreendendo a etapa de

inibir a atividade de uma invertase no tecido da raiz da referida
planta.

O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um segundo aspecto por um método para aumentar a produção de semente de uma planta compreendendo a etapa de

5 inibir a atividade de uma invertase no tecido da raiz da referida planta.

O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um terceiro aspecto por um método para aumentar a resistência a uma doença de uma planta compreendendo a etapa de

10 inibir a atividade de uma invertase no tecido da raiz da referida planta.

EM uma modalidade de acordo com o primeiro, o segundo e o terceiro aspecto da presente invenção a atividade da invertase é inibida ou por

- 15 (a) um *knock-down* da invertase ou
(b) nocaute da invertase, ou
(c) um inibidor para a invertase.

Deve ser observado que caso não indicado ao contrário, quaisquer das modalidades seguintes é uma modalidade do primeiro, do segundo e do terceiro aspecto da presente invenção.

20 Em uma modalidade o inibidor é ativo no tecido da raiz da planta.

Em uma modalidade o inibidor é um polipeptídeo.

Em uma modalidade o inibidor é codificado por um ácido nucléi-
co.

25 Em uma modalidade o ácido nucléico está sob o controle de um elemento de transcrição e/ou um elemento de translação, por meio da qual o referido elemento de transcrição e/ou o referido elemento de translação possibilita a específica transcrição e/ou translação do ácido nucléico em tecido da raiz.

30 Em uma modalidade o elemento de transcrição é um promotor, preferencialmente um promotor específico para raiz.

Em uma modalidade o promotor é um promotor indutível.

Em uma modalidade o promotor é selecionado entre o grupo compreendendo promotor *pyk10*, promotor T80-críptico, e promotor WRKY6.

Em uma modalidade o promotor é promotor T80-críptico.

Em uma modalidade o inibidor é selecionado entre o grupo compreendendo inibidores de invertase do tabaco e inibidores de invertase de *Arabidopsis*, por meio da qual, preferencialmente, os inibidores de invertase do tabaco são selecionados entre o grupo compreendendo NT-CIF1, Y12805; Nt-VIF, AY145781, e/ou, preferencialmente, os inibidores de invertase de *Arabidopsis* são selecionados entre o grupo compreendendo AtC/VIF1, At1g47960; AtC/VIF2, At5g64620, e AtC/VIF3, At3g17130.

Em uma modalidade o *knock-down* é causado por silenciamento genético pós-transcricional e/ou co-supressão.

Em uma modalidade a invertase é uma invertase selecionada entre o grupo compreendendo uma invertase solúvel, uma invertase vacuolar, uma invertase neutra / alcalina e uma invertase citoplasmática.

Em uma modalidade a invertase é uma invertase selecionada entre o grupo compreendendo uma invertase ligada à parede celular, e uma invertase extracelular, apoplásmica mas não ligada à parede celular, por meio da qual preferencialmente a invertase é uma invertase ligada à parede celular.

Em uma modalidade a invertase é uma invertase tendo uma seqüência de aminoácidos, por meio da qual a seqüência de aminoácidos é codificada por um ácido nucléico o qual é selecionado entre o grupo de seqüências de ácido nucléico compreendendo seqüências de ácido nucléico de SEQ. ID. Nº 23 a 36.

Em uma modalidade a invertase é uma invertase tendo uma seqüência de aminoácidos, por meio da qual a seqüência de aminoácidos é codificada por um ácido nucléico o qual é selecionado entre o grupo de seqüências de ácido nucléico compreendendo seqüências de ácido nucléico de SEQ. ID. Nº 1 a 22.

Em uma modalidade a doença da planta é uma doença envolvendo ou afetando o tecido da raiz

Em uma modalidade a doença da planta é transferida ou causada por um patógeno.

Em uma modalidade o patógeno é selecionado entre o grupo compreendendo *Plasmodiophora brassicae*, *Verticillium* e nematódeos, por meio da qual o nematódeo preferencialmente é *Heterodera schachtii* Schm.

Em uma modalidade a doença é selecionado entre o grupo compreendendo doenças as quais são causadas por ou associadas com um organismo selecionado entre o grupo compreendendo *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora syringae* P. *undulata*, *Oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Meloidogyne hapla*, *Phytophthora quercina* e *Rhizoctonia solani* Kühn.

Em uma modalidade a planta é um membro da família de *Brassicaceae*.

Em uma modalidade a planta é selecionado entre o grupo compreendendo colza, repolho e couve chinesa.

O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um quarto aspecto por uma molécula de ácido nucléico, preferencialmente codificando para uma invertase, tendo uma seqüência de ácido nucléico, por meio da qual a seqüência de ácido nucléico é selecionada entre o grupo de seqüências de ácido nucléico de SEQ. ID. Nº 1 a 36, ou um ácido nucléico essencialmente complementar a estas.

O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um quinto aspecto por uma molécula de ácido nucléico a qual hibridiza, preferencialmente sob condições estridentes, à seqüência de ácido nucléico de acordo com o quarto aspecto da presente invenção.

O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um sexto aspecto por uma molécula de ácido nucléico a qual, porém para a degeneração do código genético, hibridizaria, preferencialmente sob condições estridentes, ao ácido nucléico de acordo com o quarto ou o quinto aspecto da presente invenção.

O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um

sétimo aspecto por um polipeptídeo, preferencialmente uma invertase, codificado por uma molécula de ácido nucléico de acordo com qualquer um do quarto, do quinto e do sexto aspecto da presente invenção.

5 O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um oitavo aspecto por um vetor compreendendo uma molécula de ácido nucléico de acordo com qualquer um do quarto, do quinto e do sexto aspecto da presente invenção.

Em uma modalidade o vetor é um vetor de planta, mais preferencial um vetor de expressão vegetal.

10 Em uma modalidade o vetor compreende um promotor específico para raiz.

O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um nono aspecto por uma célula, preferencialmente uma célula de planta, compreendendo molécula de ácido nucléico de acordo com qualquer um do quarto, do quinto e do sexto aspecto da presente invenção e/ou um vetor de acordo com o oitavo aspecto da presente invenção.

15 O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um décimo aspecto por um tecido e/ou um órgão compreendendo uma molécula de ácido nucléico de acordo com qualquer um do quarto, do quinto e do sexto aspecto da presente invenção e/ou um vetor de acordo com o oitavo aspecto da presente invenção e/ou uma célula de acordo com o nono aspecto da presente invenção.

Em uma modalidade do décimo aspecto o tecido é um tecido da raiz e/ou o órgão é uma raiz.

25 O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um décimo primeiro aspecto por um organismo, preferencialmente uma planta, compreendendo uma molécula de ácido nucléico de acordo com qualquer um do quarto, do quinto e do sexto aspecto da presente invenção e/ou um vetor de acordo com o oitavo aspecto da presente invenção e/ou uma célula de acordo com o nono aspecto da presente invenção.

30 O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um décimo segundo aspecto pelo uso de um constructo de ácido nucléico para a

modificação do genoma de uma planta, por meio da qual o constructo compreende

- (a) um promotor específico para raiz; e
- (b) um ácido nucléico codificando para um inibidor de invertase,

5 tase,

em que o promotor e o ácido nucléico codificando para a invertase são encadeados operavelmente um ao outro.

O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um décimo terceiro aspecto pelo uso de um constructo de ácido nucléico para inibir a atividade ou presença de uma invertase, preferencialmente uma invertase em raiz e/ou tecido da raiz, por meio da qual o constructo compreende

- (c) um promotor específico para raiz; e
- (d) um ácido nucléico codificando para um inibidor de invertase,

15 tase,

em que o promotor e o ácido nucléico codificando para a invertase são encadeados operavelmente um ao outro.

O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um décimo quarto aspecto pelo uso de um constructo de ácido nucléico para aumentar a proporção de broto para raiz, produção de sementes e/ou resistência a doença de uma planta, por meio da qual o constructo compreende

- (e) um promotor específico para raiz; e
- (f) um ácido nucléico codificando para um inibidor de invertase,

25 tase,

em que o promotor e o ácido nucléico codificando para a invertase são encadeados operavelmente um ao outro.

O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um décimo quinto aspecto pelo uso de um constructo de ácido nucléico para a fabricação de um medicamento para o tratamento de uma planta doença, por meio da qual o constructo compreende

- (g) um promotor específico para raiz; e
- (h) um ácido nucléico codificando para um inibidor de invertase,

30 tase,

tase,

em que o promotor e o ácido nucléico codificando para a invertase são encadeados operavelmente um ao outro.

5 Em uma modalidade do décimo quinto aspecto da presente invenção o medicamento é para terapia genética de uma planta.

Em uma modalidade do décimo quinto aspecto da presente invenção a planta é uma célula de planta ou um tecido de planta, preferencialmente antes de regeneração para uma planta madura.

10 O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um décimo sexto aspecto pelo uso de um constructo de ácido nucléico para a produção de uma planta transgênica, por meio da qual a planta transgênica preferencialmente apresenta um ou mais de um aumento na proporção de broto para raiz, aumento na produção de sementes e aumento na resistência a patógenos e/ou doenças.

15 O problema subjacente à presente invenção é resolvido em um décimo sétimo aspecto pelo uso de um polipeptídeo de acordo com o sétimo aspecto da presente invenção como uma molécula alvo.

Em uma modalidade do décimo sétimo aspecto o polipeptídeo é uma molécula alvo para um inibidor *in vitro* e/ou *in vivo*.

20 Em uma modalidade do décimo sétimo aspecto molécula alvo é uma molécula alvo no tecido da raiz de uma planta.

Em uma modalidade do décimo sétimo aspecto da presente invenção a molécula alvo é usada em um método de triagem para a identificação de um agente de proteção vegetal.

25 Em uma modalidade do décimo sétimo aspecto da presente invenção a molécula alvo é usada em um método de triagem para a identificação de um promotor de crescimento vegetal.

30 Os presentes inventores descobriram surpreendentemente que invertases e mais especificamente a atividade de invertase de raiz é um alvo adequado para resolver os problemas subjacentes à presente invenção. Mais especificamente, o presente inventor descobriu que a inibição da atividade de invertase e mais particularmente a atividade de invertase em raiz e

tecido da raiz, respectivamente, é um meio adequado para aumentar, em plantas, a proporção de broto para raiz, a produção de sementes e resistência a doença em geral e a doenças relacionadas com raiz ou associadas com raiz em particular. Ao contrário do que pode ter sido esperado por aquele versado na técnica, uma atividade de invertase reduzida na raiz produziu um ligeiro aumento ao invés de uma redução no peso fresco da raiz. No entanto, o efeito mais pronunciado da inibir a atividade de invertase em raiz foi observado nos brotos, isto é, um aumento na biomassa com respeito a plantas controle e um aumento associado na proporção de broto para raiz. O aumento do crescimento da parte areal da planta resultou em um aumento da produção de brotos e número de síliqua e, em consequência, um aumento da produção de sementes neste tipo de planta. Em outras palavras, a compressão ou inibição raiz-específica de uma invertase é adequada para disparar estes efeitos. À medida que o ensinamento técnico da presente invenção é reduzir a atividade de uma invertase, preferencialmente uma invertase na raiz e no tecido da raiz, respectivamente, de uma planta para a qual são desejáveis os efeitos mencionados acima. Em princípio, há uma série de meios e modos disponíveis para reduzir a atividade de invertase em tecido de planta e mais especificamente em tecido da raiz. Um meio semelhante é um *knock-down* do mRNA codificando para semelhante invertase, outro meio é uso de um inibidor para a invertase por meio da qual o referido inibidor é administrado à planta a ser tratada, preferencialmente por meio de engenharia genética.

Em uma modalidade preferencial da presente invenção, a inibição da atividade de invertase ocorre no nível pós-translacional. Isto proporciona a opção de que a atividade de invertase total seja factualmente reduzida ou inibida o que está em contraste com o fenômeno observado frequentemente com *knock-down* de um único gene codificante de invertase, onde as plantas tipicamente reagem regulando para cima um gene de invertase diferente.

O termo *knock-down* conforme usado aqui, neste requerimento de patente, preferencialmente também compreende a atividade de nocaute

da invertase. Em conesão com a presente invenção, um *knock-down* ou nocaute portanto é acompanhado por uma atividade reduzida da invertase a qual é derrubada (*knocked-down*) ou arrasada (*knocked-out*). A referida redução da atividade de uma invertase é tipicamente no mínimo uma redução em cinco, mais preferencialmente 10, mais preferencialmente 20 ou mais por cento da atividade comparada com a atividade não arrasada. Será reconhecido por aqueles versados na técnica que um nocaute ou *knock-down* da invertase também pode ser realizado por um nocaute ou um *knock-down* de um ativador ou outro fator proporicionando a atividade e/ou expressão da invertase.

A atividade de uma invertase é preferencialmente definida como a hidrólise de sacarose nos monômeros de hexose. Sistemas de teste respectivos para medir a atividade de invertases são de conhecimento daqueles versados na técnica, e são descritos, por exemplo, em Roitsch et al. (1995) (Roitsch T., Bittner M., Godt D.E. (1995). Induction of apoplatic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. Plant Physiol. 108, 285-294).

Basicamente, a prova de invertase é realizada em uma modalidade como se segue. Um extrato de proteína solúvel é obtido por homogenização do tecido em um tampão de homogenização. Uma fração de proteína insolúvel é obtida agitando o pélete insolúvel em tampão de alto teor de sal de um dia para o outro. Depois de diálise destas frações, a atividade de invertase vacuolar, neutra e extracelular nas frações correspondentes são medidas determinando a quantidade de glucose liberada em uma reação com sacarose como um substrato e no pH correspondente por uso de um tampão. A glucose liberada é medida por uso de um ensaio acoplado com atividades enzimáticas de glucose oxidase e peroxidase. A concentração de glucose liberada na reação é calculada a partir do valor OD por meio do uso de uma curva de calibração. Em todos os casos, são realizadas reações de controle usando o mesmo volume de água ao invés de sacarose na mistura da reação. A atividade da invertase para cada amostra é preferencialmente

determinada em triplicata e normalizada para a concentração de proteína na prova determinada pelo método de Bradford (1976) com o kit Bio Rad.

Um modo preferencial para *knock-down* uma invertase o qual preferencialmente significa degradar o mRNA codificando para a invertase, é silenciamento genético pós-transcricional em plantas tal como, por exemplo, por um constructo anti-sentido. Este tipo de tecnologia é descrito, entre outros, em Mol J.N. et al. (Mol J.N., van der Krol A.R., van Tunen A.J., van Blokland R., de Lange P. e Stuitje A.R. (1990). Regulation of plant gene expression by antisense RNA. FEBS Lett. 268, 427-430).

Outra possibilidade para *knock-down* uma invertase é usando tecnologia de interferência de RNA conforme descrito, por exemplo, por Kusaba M. (Kusaba M. (2004). RNA interference in crop plants. Curr. Opin. Biotechnol. 15, 139-143) ou por Matzke M.A. et al (Matzke M.A., Matzke A.J., Pruss G.J. and Vance V.B. (2001). RNA-based silencing strategies in plants. Curr. Opin. Genet. Dev. 11, 221-227).

Ainda uma outra possibilidade para *knock-down* uma invertase é usando co-supressão conforme descrito, por exemplo, por Vaucheret H. (Vaucheret H., Béclin C. e Fagard. Post-transcriptional gene silencing in plants. J.Cell Sci. 114, 3083-3091), ou por Vance V. (Vance V. e Vaucheret H. (2001). RNA Silencing in Plants- Defense and Counterdefense. Science 292, 2277-2280).

Uma segunda abordagem para inibir ou reduzir a atividade de uma invertase é por um inibidor para a referida invertase. Os referidos inibidores para invertases são, em princípio, de conhecimento de uma pessoa versada na técnica. Está dentro da presente invenção que preferencialmente pode ser usado qualquer inibidor de invertase em conexão com a presente invenção, mais preferencialmente qualquer inibidor de invertase com a condição de que o respectivo inibidor deve inibir a atividade de uma invertase, o mais preferencialmente uma invertase expressada ou ativa no tecido da raiz de uma planta, por meio da qual o percurso do tecido conforme usado aqui, neste requerimento de patente, preferencialmente significa tanto intercelular ao tecido da raiz bem como extracelular ao tecido da raiz.

Em uma modalidade preferencial, o inibidor de uma/da invertase é um polipeptídeo. Conforme preferencialmente usado aqui, neste requerimento de patente, um polipeptídeo é um polímero compreendendo no mínimo dois aminoácidos os quais são ligados um ao outro por uma ligação peptídica. Mais preferencialmente, o polipeptídeo compreende 6, 10, 25 ou mais aminoácidos, por meio da qual a faixa superior é preferencialmente 50, 100, 200 e 500 aminoácidos. Em conexão com a presente invenção, o termo polipeptídeo e proteína são usados em uma maneira sinônima. Preferencialmente, o tamanho dos inibidores de invertase é de aproximadamente 500 nucleotídeos e 166 a 192 aminoácidos, respectivamente, de acordo com uma comparação feita por Rausch e Greiner (2004) (Rausch T. e Greiner S. (2004). *Plant protein inhibitors of invertases*. Biochim. Biophys. Acta 1696, 253-261), e o peso molecular é de aproximadamente 18 kDa. A seqüência de proteína não é bem conservada, embora seja observada uma conservação de seqüência mais forte na parte de N-terminal do que nos C-terminais, e inibidores de invertase extracelular e vacuolar da mesma espécie partilham somente 47% de identidade no nível da seqüência, com quatro cisteínas em posições conservadas em todos os inibidores de invertase descritos até o momento.

Inibidores de invertase adicionais os quais podem ser usados em uma modalidade da presente invenção são descritos em Greiner S. et al. (Greiner S., Krausgrill S. and Rausch T. (1998). Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor. Proof of function of the recombinant protein and expression analysis during plant development. *Plant Physiol.* 116, 733-742); Greiner S. et al. (Greiner S., Rausch T., Sonnewald U. and Herbers K. (1999). Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers. *Nature Biotech.* 17, 708-711), Krausgrill S. et al. (Krausgrill S., Sander A., Greiner S., Weil M. and Rausch T. (1996). Regulation of cell wall invertase by a proteinaceous inhibitor. *J. Exp. Bot.* 47, 1193-1198), Krausgrill S. et al. (Krausgrill S., Greiner S., Köster U., Vogel R. and Rausch T. (1998). In transformed tobacco cells the apoplasmic invertase inhibitor operates as a regulatory switch of cell wall inver-

tase. *Plant J.* 13, 275-280), Link M. et al. (Link M., Rausch T. and Greiner S. (2004). In *Arabidopsis thaliana*, the invertase inhibitors AtC/VIF1 and 2 exhibit distinct target enzyme specificities and expression profiles. *FEBS Lett.* 573, 105-109), Rausch T. and Greiner S. (2004). Plant protein inhibitors of invertases. *Biochim. Biophys. Acta* 1696, 253-261), Sander A. et al. (Sander A., Krausgrill S., Greiner S., Weil M. and Rausch T. (1996). Sucrose protects cell wall invertase but not vacuolar invertase against proteinaceous inhibitors. *FEBS Lett.* 385, 171-175), Weil M. et al. (Weil M., Krausgrill S., Schuster A. and Rausch T. (1994). A 17-kDa *Nicotiana tabacum* cell-wall peptide acts as in-vitro inhibitor of the cell-wall isoform of acid invertase. *Planta* 193, 438-445) and Wolf S. et al (Wolf S., Grsic-Rausch S., Rausch T. and Greiner S. (2003). Identification of pollen-expressed pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 555, 551-555).

Inibidores de invertase adicionais os quais são úteis na prática da presente invenção, são descritos em Gerrits, N. et al. (Gerrits, N., Turk, S., van Dun, K., Hulleman, S., Visser, R., Weisbeek, P., Smeekens, S. Sucrose Metabolism in Plastids. *Plant Physiol.* 2001 Feb; 125(2):926-934), Koch, K. (Koch, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin Plant Biol.* 2004 Jun; 7(3):235-246.); Plant invertase inhibitors: Expression in cell culture and during plant development AU: Greiner,-Steffen [Author]; Koster,-Ulrike [Author]; Lauer,-Katja [Author]; Rosenkranz,-Heiko [Author]; Vogel,-Rolf [Author]; Rausch,-Thomas [Reprint-author] SO: *Australian-Journal-of-Plant-Physiology.* 2000; 27(8-9): 807-814, Hothorn, M. et al. (Hothorn, M., D'Angelo, I., Marquez, J. A., Greiner, S., Scheffzek, K. The invertase inhibitor Nt-CIF from tobacco: a highly thermostable four-helix Bundle with an unusual N-terminal extension. *J Mol Biol.* 2004 Jan 23; 335(4):987-995), Hothorn, M. et al. (Hothorn, M., Wolf, S., Aloy, P., Greiner, S., Scheffzek, K. Structural insights into the target specificity of plant invertase and pectin methylesterase inhibitory proteins. *Plant Cell.* 2004 Dec; 16(12):3437-3447), Sonnewald, U. et al. (Sonnewald, U., Brauer, M., von Schaewen, A., Stitt, M., Willmitzer, L. Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the

- cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying saccharose metabolism and sink/source interactions. *Plant J.* 1991 Jul; 1(1):95-106), Bate NJ et al. (Bate NJ, Niu X, Wang Y, Reimann KS, Helentjaris TG. An invertase inhibitor from maize localizes to the embryo surrounding region during early kernel development. *Plant Physiol.* 2004 Jan;134(1):246-54), Scognamiglio MA et al. (Scognamiglio MA, Ciardiello MA, Tamburrini M, Carratore V, Rausch T, Camardella L. The plant invertase inhibitor shares structural properties and disulfide bridges arrangement with the pectin methylesterase inhibitor. *J Protein Chem.* 2003 May;22(4):363-9), Sayago JE et al. (Sayago JE, Vattuone MA, Sampietro AR, Isla MI. An invertase inhibitory protein from *Pteris deflexa* link fronds. *J Enzyme Inhib.* 2001 Dec;16(6):517-25), Sayago JE et al. (Sayago JE, Vattuone MA, Sampietro AR, Isla MI. Proteinaceous inhibitor versus fructose as modulators of *Pteris deflexa* invertase activity. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2002 Apr;17(2):123-30), Ordonez RM et al. (Ordonez RM, Isla MI, Vattuone MA, Sampietro AR. Invertase proteinaceous inhibitor of *Cyphomandra betacea* Sendt fruits. *J Enzyme Inhib.* 2000;15(6):583-96), e Cheng SH et al. (Cheng SH, Liu J, Song BT, Xie CH. Related Articles, [Clonagem de St-inh cDNA de inibidor de invertase de batata e sua expressão em *E. coli* e análise funcional] *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* 2004 Aug;37(4):269-75. Chinês).

Em uma modalidade preferencial, o inibidor é codificado por um ácido nucléico. Será reconhecido por aqueles versados na técnica que, com base na seqüência de aminoácidos de um inibidor de uma invertase, em princípio a seqüência codificante para o inibidor pode ser percebida por aquele versado na técnica. Devido à *generacy* do código genético, no entanto, é possível verdadeiramente uma série de seqüências diferentes. Em vista disto uma pessoa versada na técnica levará em consideração o uso de códon preferencial da planta ou espécie vegetal na qual o inibidor da invertase deve ser introduzido, preferencialmente deve ser introduzido por meio de transferência do ácido nucléico codificando para o referido inibidor. Mais preferencialmente, o ácido nucléico codificando para o referido inibidor será um ácido nucléico codificando para o inibidor, por meio da qual o referido inibi-

dor é preferencialmente isolado de fontes bacterianas, fúngicas e vegetais.

Entre a variedade de inibidores de invertase conhecidos os quais são, em princípio, adequados para uso na presente invenção, o inibidor de invertase da parede celular do tabaco conforme descrito por Greiner et al. 1998, um inibidor de invertase da parede celular (At5g46940), também referido aqui, neste requerimento de patente, como AtC/VIF2 e um inibidor de invertase vacuolar At1g47960, também referido aqui, neste requerimento de patente, como AtC/VIF1 ambos de *Arabidopsis*, são particularmente adequados para a prática da presente invenção. É sabido que AtC/VIF1 (At1g47960) inibe especificamente a atividade da invertase vacuolar, ao passo que AtC/VIF2 (At5g46940) inibe ambas, isto é, a atividade da invertase vacuolar bem como a a atividade da invertase da parede celular, embora tenha uma afinidade dez vezes maior para invertase vacuolar do que para invertase da parede celular (Link et al., 2004). Um inibidor de invertase adequado adicional é Nt-inh1 conforme descrito no requerimento de patente internacional No. WO 98/04722.

À parte dos inibidores de invertase específicos mencionados acima, inibidores de invertase adicionais estão disponíveis e em princípio são adequados para a prática da presente invenção. Mais especificamente, os referidos inibidores de invertase são aqueles derivados dos 14 genes do genoma de *Arabidopsis thaliana* com identidade de seqüência com inibidores de invertase vacuolar e da parede celular do tabaco. Destes, dois genes, At1g47960 e At3g17130, agrupam com os inibidores de invertase do tabaco, e dois mais, At1g48020 e At3g17220, com inibidores de metilesterase de pectina. At2g31430, At3g55680, At5g64620, At3g12880 e At5g50070 não agrupam com quaisquer destes em uma árvore filogenética, ao passo que At5g46940/70/60/80 formam um subgrupo ligado sobre o cromossoma 5 (Rausch e Greiner, 2004, supra).

É determinada a atividade de inibidor de invertase em uma modalidade preferencial por meio do uso de frações de proteína purificada tanto para o inibidor de invertase quanto a atividade de invertase correspondente. Para a determinação de atividade de inibidor de invertase, as preparações

de invertase e inibidor de invertase são misturadas e pré-incubadas a 37°C por 1 hora. Depois desta pre-incubação, sacarose é adicionada para uma concentração de 20 mM e a reação é incubada a 26°C durante 30 minutos. A quantidade de glucose liberada na prova é determinada enzimaticamente conforme descrito em Weil M. et al. (Weil et al., 1994 ; Weil M., Krausgrill S., Schuster A. e Rausch T. (1994). A 17-kDa *Nicotiana tabacum* cell-wall peptide acts as in-vitro inhibitor of the cell-wall isoform of acid invertase. *Planta* 193, 438-445), ou Greiner S. et al. (Greiner S., Krausgrill S. and Rausch T. (1998). Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor. Proof of function of the recombinant protein and expression analysis during plant development. *Plant Physiol.* 116, 733-742), or Link M. et al. (Link M., Rausch T. and Greiner S. (2004). In *Arabidopsis thaliana*, the invertase inhibitors AtC/VIF1 and 2 exhibit distinct target enzyme specificities and expression profiles. *FEBS Lett.* 573, 105-109).

Na determinação da atividade de inibidor de invertase podem surgir complicações pelo fato de não serem usados extrato purificados mas extratos brutos, contendo além disso atividades enzimáticas de invertase. Pode existir complicação adicional no fato de que o complexo formado entre a invertase e o inibidor podem, em princípio, se dissociar durante a preparação dos extratos. Por estas razões, preferencialmente se usa uma prova de "extrato misto" na qual uma alíquota do extrato de raiz de uma planta transgênica, portanto expressando o inibidor de invertase, é misturada com uma alíquota de um extrato de folha de uma planta selvagem. A mistura, feita no tampão de pH apropriado, é incubada 30 min a 37°C para a formação do complexo entre a invertase e o inibidor de invertase. Depois da pré-incubação, sacarose é adicionada em uma concentração final de 5 mM e a reação é incubada por 30 min a 26°C. A reação é interrompida em gelo e a glucose liberada é determinada por teste GOD e comparada com o valor adicionado dos extratos independentes incubados separadamente. Considerando que raízes controle dão valores ainda maiores do que os valores adicionados correspondentes, uma redução de até 50% dos valores adicionados é obtida para raízes transgênicas.

É óbvio para uma pessoa versada na técnica que a expressão do ácido nucléico codificando para o inibidor deve ser controlado por elementos de controle. Preferencialmente, os elementos de controle referidos são ativos no nível de transcrição e/ou no nível de translação. Em associação com a presente invenção foi visto que é particularmente adequado ter um elemento transcricionalmente ativo tal um promotor para controlar a disponibilidade e a atividade, respectivamente, do inibidor em uma célula e tecido, respectivamente, de modo a inibir a atividade de invertase. De modo a proporcionar a especificidade para tecido de inibição de invertase como objeto para uma modalidade preferencial dos vários aspectos da presente invenção, a saber, especificidade para tecido da raiz, e deste modo aumentar a proporção de broto para raiz, a produção de sementes e a resistência a uma doença, o promotor é um promotor específico para raiz. O promotor referido é preferencialmente ligado operavelmente ao ácido nucléico codificando para o inibidor.

Promotores adequados para semelhante finalidade são, em princípio, de conhecimento de uma pessoa versada na técnica. Promotores mais preferenciais são os seguintes: o promotor pPyk10 o qual é um promotor de uma Arabidopsis mirosinase (Nitz et al., 2001 e também descrito no requerimento de patente internacional No. WO 01/44454 e no requerimento de patente alemã No. DE 19960843) e o promotor críptico também referido aqui, neste requerimento de patente, como promotor T80-críptico conforme descrito no requerimento de patente europeia NO. EP 1 196 581 e em Mollier et al. 2000, Plant-Cell-Reports, 19, 1076-1083, os quais são ambos promotores específicos para raiz de Arabidopsis. Outros promotores os quais, em princípio, são adequados na prática da presente invenção são os promotores específicos para raiz descritos no requerimento de patente internacional No. WO 02/040687 o qual descreve diferentes promotores específicos tecido para isolados de beterrabas sacarinas, especialmente dois promotores específicos para raiz 2-1-48 e 2-1-36 e os promotores descritos no requerimento de patente internacional No. WO 00/77187. Os promotores descritos no requerimento de patente internacional No. WO 00/77187 são isola-

dos de tomate e tabaco o qual é tanto específico para *tapetum* quanto específico para tabacó.

Adicionalmente, podem ser usados promotores indutíveis tais como aqueles os quais são indutíveis por esteróides conforme descrito, por exemplo, por Zuo et al. (Zuo et al., 2002).

Está dentro da presente invenção, que a invertase é na verdade qualquer atividade de invertase a qual esteja preferencialmente presente em raízes e/ou tecido da raiz e a qual possa ser visada pelos métodos revelados aqui, neste requerimento de patente, a saber por *knock-down* e/ou atividade de um inibidor. Será reconhecido por aquele versado na técnica que a especificidade do inibidor para uma invertase tem de ser dada no mínimo na medida que o inibidor seja adequado para inibir a ou parte da atividade de uma atividade de invertase em raízes e tecido da raiz, respectivamente. Invertases preferenciais as quais podem portanto ser visadas são aquelas descritas aqui, neste requerimento de patente, e mais especificamente a invertase tendo uma seqüência de ácido nucléico de acordo com a SEQ. ID. Nº 15 ou a SEQ. ID. Nº 26. A tabela seguinte representa várias invertases de *Arabidopsis* as quais são adequadas na prática da presente invenção como alvos bem como o tecido / órgão onde elas são expressadas.

| Invertase | Locus genético | Folha | Caule | Raiz | Pequeno botão de flor | Grande botão de flor | de Flor | Anteras | Pistilo | Síli- quas jovens | Mu- da |
|--------------------|----------------|-------|-------|------|-----------------------|----------------------|---------|---------|---------|-------------------------|-----------|
| AtcwINV 1 | At3g13790 | +++ | + | ++++ | ++ | ++ | + | - | + | + | +++ |
| AtcwINV 2 | At3g52600 | - | - | - | - | + | ++ | ++++ | + | - | - |
| AtcwINV 4 | At2g36190 | - | - | - | -/+ | + | ++ | +++ | + | - | - |
| AtcwINV 5 | At3g13784 | ++ | + | ++ | - | + | + | +++ | + | + | +++ + |
| At β fruct 3 | | ++ | + | ++++ | - | + | ++ | ++ | + | + | |
| At β fruct 4 | | +++ | +++ | ++ | + | ++ | +++ | +++ | ++ | ++ | |

20

Nesta tabela o nível de RNAm é categorizado como se segue:

++++:indica um nível muito alto de RNAm

- +++:indica um alto nível de RNAm
- ++:indica um alto nível moderado de RNAm
- +:indica um baixo nível relativo de RNAm
- :nenhum RNAm detectável

5 À parte de aumentar, conforme resumido aqui, neste requeri-
 mento de patente, a proporção de broto para raiz e a produção de sementes
 inibindo a atividade de uma invertase, mais preferencialmente de uma inver-
 tase de raiz, também doenças de plantas podem ser tratadas e prevenidas,
 respectivamente. O fundamento lógico subjacente a este método para o tra-
 10 tamento de uma planta sofrendo de uma doença de planta é por meio da
 redução do suprimento de carboidrato para a raiz cujos patógenos que se
 alimentam dos carboidratos da raiz, são privados de sua fonte de energia. À
 medida que várias doenças causadas por vários patógenos podem ser trata-
 15 das por meio da qual o termo tratamento conforme preferencialmente usado
 aqui, neste requerimento de patente, também compreende prevenção de
 semelhante doença e portanto proteção de plantas contra a doença referida
 as quais são, em princípio, suscetíveis à doença referida ou estão em risco
 de sofrer de semelhante doença. Será óbvio para uma pessoa versada na
 técnica que uma série de doenças e patógenos pode ser então prevenida e
 20 tratada, respectivamente. Entre outros, um patógeno é o fungo *Plasmodio-*
phora brassicae o qual está causando doença de raiz deformada (*club*
root). Este fungo penetra na raiz de brassicaceae, em conseqüência do que
 as raízes mostram um importante crescimento afetando em uma maneira
 negativa tanto a captação de água quanto de nutrientes pela planta. Em
 25 conseqüência, as plantinhas crescem pobremente e as folhas mais velhas
 amarelecem. Os esporos do fungo podem sobreviver no solo até 20 anos de
 modo que este tipo de doença é estimulado por uma intensa rotação e co-
 lheita. Plantas particularmente afetadas são plantas cultivadas tais como
 colza, repolho, rabanete, mostarda e crucíferas, bem como plantas ornamen-
 30 tais, cada uma preferencialmente da família brassicaceae.

Outro patógeno o qual pode ser portanto prevenido e/ou tratado
 de acordo com a presente invenção é o fungo *Verticillium* o qual causa, entre

outros, braquiomicrose e afeta uma série de plantas, inclusive plantas ornamentais, árvores ornamentais, árvores frutíferas, legumes, verduras e plantas do campo. Portanto, as doenças as quais podem ser prevenidas e/ou tratadas de acordo com a presente invenção são aquelas causadas por ou associadas com *Verticillium*.

Um grupo de patógenos adicionais os quais podem ser portanto prevenidos e/ou tratados de acordo com a presente invenção são nematódeos os quais se alimentam de carboidratos das raízes de plantas hospedeiras. As plantas particularmente afetadas por este tipo de patógeno são milho, cereais e outras monocotiledôneas e dicotiledôneas. Portanto, as doenças as quais podem ser prevenidas e/ou tratadas de acordo com a presente invenção são aquelas causadas por ou associadas com nematódeos.

Em uma modalidade preferencial, a invertase a qual é inibida pelo inibidor de invertase de modo a aumentar a proporção de broto para raiz, produção de sementes e resistência de uma planta a uma doença, mais particularmente quaisquer das doenças descritas aqui, neste requerimento de patente, é uma invertase de acordo com a presente invenção.

As invertases de acordo com a presente invenção são definidas por sua seqüência de ácido nucléico conforme revelado aqui, neste requerimento de patente. As invertases em geral, têm a seguinte seqüência de aminoácidos em seu centro catalítico: cisteína (C) – prolina (P) – asparagina (D) a qual, no nível de ácido nucléico, corresponde a TGT/C – CCT/C/A/G – GAT/C em caso de invertases da parede celular, e cisteína (C) – valina (V) – asparaginas (D), ou no nível de ácido nucléico, TGT/C, GTT/C/A/G – GAT/C para invertases vacuolares.

As invertases da parede celular conforme revelado aqui, neste requerimento de patente, podem ser comparadas com as seis seqüências de invertases de *Arabidopsis* conhecidas (AtcwlINV 1 – 6) e foi visto que a invertases da parede celular pode ser ligada às invertases 1 a 4 de *Arabidopsis* conforme representado na tabela 1.

As invertases vacuolares da presente invenção podem ser alinhadas a registros do banco de dados cujo resultado está representado na

tabela 2.

Também está dentro da presente invenção que são compreendidas moléculas de ácido nucléico as quais são hibridizadas às seqüências de ácido nucléico de acordo com a SEQ. ID. NO 1 a Z, preferencialmente sob condições estringentes. As condições estringentes referidas são, por exemplo, descritas em Sambrook J., Fritsch E.F. e Maniatis T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.

Mais preferencialmente amostras de RNA são fracionadas em géis de agarose de formaldeído, transferidas para membranas de nitrocelulose e hibridizadas a cDNA marcado com P³² do gene correspondente sob condições de rotina (Sambrook et al., 1989), preferencialmente a 42°C.

Além disso, está dentro a presente invenção que a invenção se refere a uma molécula de ácido nucléico a qual, porém para a degeneração do código genético, hibridizaria, preferencialmente sob condições estringentes, à molécula de ácido nucléico revelada aqui, neste requerimento de patente, cada uma preferencialmente codificando para invertase.

Também está dentro a presente invenção que a molécula de ácido nucléico respectiva ou codificando para um inibidor de uma invertase ou codificando para a invertase de acordo com a presente invenção, são clonadas em um vetor. Preferencialmente o vetor referido é um vetor de expressão. Para a finalidade de produzir qualquer polipeptídeo codificado pelos ácidos nucléicos de acordo com a presente invenção ou aqueles descritos aqui, neste requerimento de patente, um vetor de expressão é usado, por meio da qual o vetor de expressão referido é um vetor viral, microbiano, vegetal ou animal, preferencialmente um vetor de planta. Também está dentro a presente invenção que o vetor referido é inserido em uma célula, por meio da qual a célula referida é preferencialmente uma célula de planta. Também está dentro a presente invenção que a célula vegetal é cultivada em uma planta madura. Em uma modalidade adicional a célula e a planta madura geram uma semente contendo o vetor referido ou uma célula contendo o vetor referido. Preferencialmente a semente e/ou a planta é uma planta hí-

brida a qual preferencialmente não é capaz de ser propagada por meios biológicos comuns, isto é, cruzamento e propagação.

Também está dentro a presente invenção que o vetor contém um promotor específico para raiz conforme preferencialmente descrito aqui, neste requerimento de patente.

Em um aspecto adicional, a invenção se refere a um constructo de ácido nucléico o qual compreende um promotor específico para raiz e um ácido nucléico codificando para um inibidor de invertase. O promotor específico para raiz pode ser quaisquer dos promotores descritos aqui, neste requerimento de patente. O inibidor de invertase é preferencialmente qualquer inibidor de invertase descrito aqui, neste requerimento de patente. Similar ao vetor, o promotor específico para raiz e o ácido nucléico codificando para o inibidor de invertase são encadeados operavelmente um ao outro possibilitando a expressão do inibidor de invertase. Este constructo de ácido nucléico pode ser introduzido em um vetor e uma célula, respectivamente, conforme definido acima. Preferencialmente a célula referida é regenerada para um tecido e planta, respectivamente e uma planta regenerada ou obtida daí tanto por meios de engenharia genética bem como por propagação convencional. A planta referida pode ser qualquer planta e qualquer espécie e família ou gênero, conforme descrito aqui, neste requerimento de patente.

Métodos para a introdução deste constructo genético e vetor, respectivamente, em uma célula de planta, a qual é preferencialmente uma célula de planta embrionária, são de conhecimento de uma pessoa versada na técnica e são descritos, por exemplo, em Clough S.J. e Bent A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743. Métodos de transformações preferenciais são Agro, bombardeamento de partículas, e banho floral. Mais preferencialmente, plantas de *Arabidopsis* são transformadas por banho floral de acordo com o método de Clough e Bent (1998). As plantas são cultivadas sob dias longos até a florescência e podadas para estimular a proliferação de ramos secundários. Uma cepa de *Agrobacterium*, carregando o constructo em um vetor binário, é cultivada em uma grande cultura em YEB

a 28°C. Subseqüentemente, o *Agrobacterium* é centrifugado e ressuspendido para uma OD_{600nm}=0,8 em solução de sacarose a 5%. Silwett é adicionado a uma concentração de 0,05% e as flores são banhadas por imersão na solução por 2 a 3 segundos. As plantas banhadas são cobertas com envoltório de saran durante 24 horas e no escuro, para manter elevada umidade. Subseqüentemente, são descobertas e cultivadas normalmente. A irrigação é interrompida à medida que as sementes amadurecem e as sementes são selecionadas em placas contendo antibiótico.

Em outro aspecto, a invenção também se refere a este tipo de planta a qual é preferencialmente uma planta transgênica. Em uma modalidade particularmente preferencial, o constructo genético está sob controle de um promotor indutível conforme de conhecimento de uma pessoa versada na técnica. Promotores indutíveis particularmente preferenciais são, por exemplo, mas não limitados a, um promotor indutível de dexametasona tal como descrito em Aoyama T., et al. (Aoyama T. and Chua N.H. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.* 11, 605-612), ou McNellis T.W. et al. (McNellis T.W., Mudgett M.B., Li K., Aoyama T., Horvath D., Chua N.-H. and Staskawicz B.J. (1998). Glucocorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic *Arabidopsis* induced hypersensitive cell death. *Plant J.* 14, 247-257), ou um promotor indutível de esteróide tal como descrito em Schena M. et al. (Schena M., Lloyd A.M. and Davis R.W. (1991). A steroid-inducible gene expression system for plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10421-10425), ou Zuo J. et al. (Zuo J., Niu Q.W. and Chua N.H. (2000). An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.* 24, 265-273).

Em um aspecto adicional, a presente invenção se refere a sementes derivadas da planta referida, preferencialmente planta recombinante.

Em um aspecto adicional da presente invenção, os ácidos nucleicos, vetores, células e plantas bem como outros organismos contendo os vetores referidos codificando para quaisquer das invertases conforme revelado aqui, neste requerimento de patente, são usados para a produção da

invertase respectiva. Para semelhante finalidade, as células respectivas expressando o ácido nucléico codificando para a invertase são cultivadas em um recipiente de reação apropriado contendo um meio apropriado e subsequentemente a invertase é isolada e/ou purificada. Os métodos de cultivo e
5 isolamento / purificação referidos são de conhecimento de uma pessoa versada na técnica.

Em um aspecto ainda adicional a presente invenção se refere ao uso de quaisquer das invertases conforme revelado aqui, neste requerimento de patente, como uma molécula alvo. Uma molécula alvo conforme usado
10 aqui, neste requerimento de patente, é uma molécula a qual é ou visada *in vivo* ou *in vitro* ou *in silico*. O direcionamento referido pode significar, em uma modalidade preferencial, que a invertase é objeto para um processo de triagem, preferencialmente um processo de triagem *in vitro* ou um processo de triagem *in silico*.

15 Em associação com o processo de triagem *in vitro*, a molécula alvo como tal é proporcionada e um ou vários compostos, preferencialmente taken from uma biblioteca, são testados tipicamente contactando o composto com a molécula alvo, quer ou não quaisquer dos compostos tenham um impacto sobre o alvo, preferencialmente quer ou não haja um aumento ou redução na atividade do alvo, isto é, a atividade de invertase. Como a molécula
20 alvo é uma invertase, são de conhecimento de uma pessoa versada na técnica provas para avaliar se um composto, também referido aqui, neste requerimento de patente, como um composto candidato, tem um efeito inibitório ou de ativação sobre a invertase. As moléculas referidas podem ser
25 adicionalmente usadas como um candidato, orientação ou composto para a fabricação de um produto agroquímico. Preferencialmente o produto agroquímico reefrido é um agroquímico adequado para aumentada proporção de broto para raiz, produção de sementes e/ou aumentar a resistência, preferencialmente se mostrar um efeito inibitório sobre a invertase.

30 Em uma triagem *in silico*, a molécula alvo, isto é, quaisquer das invertases conforme descrito aqui, neste requerimento de patente, é usada como uma molécula contra a qual o ajuste de outras moléculas é testado ou

outras moléculas são designadas por meio de análise e design computacional de modo a ajustar à molécula alvo preferencialmente tal como para inibir ou promover a atividade da molécula alvo. Preferencialmente o ajuste referido se refere ao centro ativo da invertase. O composto identificado deste modo, quer identificado por triagem *in vitro* e/ou por triagem *in silico* pode ser essencialmente usado em associação com os métodos revelados aqui, neste requerimento de patente. O composto identificado deste modo pode ser então um promotor de crescimento vegetal ou um agente protetor de planta, particularmente no caso do composto referido na verdade estar reduzindo a atividade de uma invertase, mais preferencialmente uma invertase de raiz e sua atividade, respectivamente, de acordo com a presente invenção.

Em uma modalidade preferencial de qualquer aspecto da presente invenção a invertase é uma invertase de planta, e um inibidor para uma invertase é um inibidor para invertase de planta, por meio da qual o inibidor é uma planta ou um inibidor derivado de planta.

A invenção é agora adicionalmente ilustrada pelas figuras anexas, exemplos e a listagem de seqüência a partir das quais podem ser obtidas características, modalidades e vantagens adicionais.

Fig. 1 mostra a tabela 1 atribuindo as invertases da presente invenção a invertases de *Arabidopsis* conhecidas;

Fig. 2 mostra a tabela 2 atribuindo as invertases da presente invenção a invertases conhecidas indicando os registros do banco de dados tendo a maior homologia com as invertases de acordo com a presente invenção;

Fig. 3 é um diagrama indicando a distribuição de plantas como uma função da proporção de broto para raiz para as várias plantas transgênicas (AT) e as plantas selvagens correspondentes (WTC010) cultivadas em meio contendo 1 % de sacarose, por meio da qual o número total de plantas de uma variedade distinta é ajustado para 1 (100 %) e é indicada a porção relativa de plantas as quais têm uma proporção específica de broto para raiz;

Fig. 4 é o resultado de uma análise *Northern blot* representando a expressão de RNA de inibidores de invertase em raízes de plantas trans-

gênicas em comparação com plantas selvagens controle;

Fig. 5 é o resultado de uma análise *Northern blot* da expressão de RNA de *Cin1* em raízes de plantas transgênicas;

Fig. 6 é um diagrama, similar ao diagrama da Fig. 3, indicando a distribuição de plantas como uma função da proporção de broto para raiz para as várias plantas transgênicas (AT) e as plantas selvagens correspondentes (WTCol0) cultivadas em perlita;

Fig. 7 é o resultado de uma análise *Southern blot* de diferentes linhagens independentes contendo diferentes número de cópias e sítios de inserção para *AtC/Vif1*(At1g47960);

Fig. 8 é um diagrama, similar ao diagrama da Fig. 3, indicando a distribuição de plantas como uma função da proporção de broto para raiz para várias plantas transgênicas (AT) e as plantas selvagens correspondentes (WTCol0) inicialmente cultivadas em meio contendo 1 % de sacarose e subsequentemente transferidas para perlita;

Fig. 9 é uma fotografia do fenótipo de plantas selvagens e transgênicas depois de 49 dias de crescimento em condições de dia longo;

Fig. 10 é uma fotografia do fenótipo de plantas selvagens e transgênicas depois de pré-crescimento em meio de seleção contendo glucose e transferência para perlita depois de 14 dias tirada depois de 43 dias de crescimento em condições de dia curto ;

Fig. 11 é uma fotografia do fenótipo de plantas selvagens e transgênicas depois de pré-crescimento em meio de seleção contendo glucose e transferência para perlita depois de 14 dias, por meio da qual as fotografias foram tiradas depois de 30 dias de crescimento em condições de dia longo;

Fig. 12 é uma fotografia do fenótipo de plantas selvagens e transgênicas depois de pré-crescimento em meio de seleção contendo glucose e transferência para perlita depois de 14 dias, por meio da qual as fotografias foram obtidas depois de 40 dias de crescimento em condições de dia longo;

Fig. 13 indica as referências internas e as seqüências de ácido

nucléico das invertases de acordo com a presente invenção;

Fig. 14 mostra uma tabela indicando o nível de expressão de diferentes invertases de colza em diferentes órgãos da planta indicando que invertase da parede celular Inv 3(A1) e invertase E6 são invertases particularmente preferenciais para a prática da presente invenção;

Fig. 15 mostra um mapa de restrição para plasmídeos pmcg2 e pmcg3;

Fig. 16 é a planilha de plasmídeos para MCG-4;

Fig. 17 é a planilha de plasmídeos para MCG-5;

Fig. 18 é a planilha de plasmídeos para MCG-3;

Fig. 19 é um diagrama esquemático ilustrando a produção de pmcg4;

Fig. 20 é um diagrama esquemático ilustrando a produção de pmcg5;

Fig. 21 é a planilha de plasmídeos para MCG-6;

Fig. 22 é a planilha de plasmídeos para MCG-7;

Fig. 23 é um diagrama esquemático ilustrando a produção de pmcg6;

Fig. 24 é um diagrama esquemático ilustrando a produção de pmcg7;

Fig. 25 é a planilha de plasmídeos para MCG-8;

Fig. 26 é a planilha de plasmídeos para MCG-9;

Fig. 27 é um diagrama esquemático ilustrando a produção de pcmg 11-9;

Fig. 28 é a planilha de plasmídeos para MCG-13

Fig. 29 é um diagrama esquemático ilustrando a produção de pmcg 12-1

Fig. 30 é a planilha de plasmídeos para MCG-19;

Fig. 31 é um diagrama esquemático ilustrando a produção de pcmg 8;

Fig. 32 é a planilha de plasmídeos para MCG-10;

Fig. 33 é a planilha de plasmídeos para MCG-11;

Fig. 34 é uma fotografia mostrando exemplos representativos de uma infecção de plantas selvagens (*Columbia*) e plantas transgênicas expressando o inibidor de invertase de *Arabidopsis* AtC/VIF2, At5g46940 sob controle do promotor pyk10 (pyk10:inibidor de invertase) por *Plasmodiophora brassicae*; ao passo que as raízes das plantas selvagens mostram graves sintomas de doença tais como extensiva protuberância (esquerda), as raízes das plantas transgênicas são essencialmente livres de sintomas exceto pela região do hipocótilo, uma região onde o promotor não é expressado. (A);

10 e uma tabela indicando o índice de doença de acordo com Siemens et al. (Siemens et al., 2002) uma quantificação do grau de sintomas, de várias cepas de *A. thaliana* recombinantes onde infectadas por *Plasmodiophora brassicae*; em comparação com plantas controle selvagens (índice de doença 1) as plantas de linhagens transgênicas individuais expressando o inibidor de invertase de *Arabidopsis* AtC/VIF2 ou sob controle do promotor pyk10 ou do promotor críptico-T80 são fortemente afetadas; os dados indicam uma correlação positiva entre número de cópias e proteção (B);

20 Fig. 35 representa uma tabela onde o efeito de nocautes (KO) de única invertase sobre o índice de doença é indicado para várias linhagens celulares;

Fig. 36 mostra diagramas indicando a atividade de várias invertases (Figs. 36 A; B;), o teor de glucose e frutose das raízes (Fig. 36 C), a proporção dos teores de glucose e frutose para o teor de sacarose das raízes (Fig. 36 D), o grau de micorrização (Fig. 36 E), cada um depois de 3,5 e 5 semanas, respectivamente, de infecção com *G. intraradices* em linhagem selvagem e duas linhagens de planta de *A. thaliana*, por meio da qual InvInh significa inibidor de invertase, e uma microfotografia de estrutura fúngica corada com tinta em uma linhagem selvagem e uma das linhagens celulares submetida à Fig. 36 A a E (Fig. 36 F);

30 Fig. 37 mostra um diagrama indicando o resultado de uma análise de biomassa para duas linhagens de tabaco recombinante diferentes expressando o inibidor de invertase AtC/VIF2 (98-1-10, 98-1-4) e plantas de

tabaco selvagens; e por meio da qual a Fig. mostra a proporção de raiz para broto; e

Fig. 38 mostra vários diagramas indicando os resultados da determinação das atividades de diferentes isoenzimas invertase tais como invertase apoplástica, invertase vacuolar, e invertase citosólica, em raízes e folhas de plantas de tabaco selvagens (wt) e duas linhagens de tabaco recombinante diferentes expressando o inibidor de invertase AtC/VIF2 (98-1-10, 98-1-4).

10 Exemplo 1: Produção de células de planta transgênica

Nesta abordagem, a invertase da parede celular de *Chenopodium rubrum* foi usada de modo a prevenir possível inibição de genes de *Arabidopsis thaliana* pelos inibidores de invertase de plantas. Diferentes inibidores de invertase foram usados para a redução da atividade de invertase de planta na raiz: um inibidor de invertase da parede celular do tabaco (Greiner et al., 1998), e dois genes de *Arabidopsis* com maior homologia para inibidor de invertase da parede celular (At5g46940) e vacuolar (At1g47960). Como foram obtidos resultados similares para os inibidores de invertase do tabaco e de *Arabidopsis*, nós enfocamos os dois genes de *Arabidopsis* para todas as abordagens subsequentes. Recentemente, foi obtida evidência de comprovação de função *in vitro* para estes dois inibidores de invertase, com AtC/VIF1 (At1g47960) especificamente inibindo a atividade de invertase vacuolar, ao passo que AtC/VIF2 (AT5g46940) inibe ambas embora com uma afinidade dez vezes maior para invertase vacuolar do que para invertase da parede celular (Link et al., 2004). Mas até o momento, não foi demonstrada comprovação de atividade *in vivo*. Os genes mencionados foram produzidos sob o controle de dois promotores específicos para raiz de *Arabidopsis* diferentes descritos na literatura: o promotor *pyk10* de uma mirosinase de *Arabidopsis* (Nitz et al., 2001), e um promotor críptico reportado por Mollier et al. (2000) o qual também é referido aqui, neste requerimento de patente, como "crípticoT80" ou promotor T80-críptico. Além disso, um sistema indutível no qual a expressão do transgene é induzida por esteróides também foi usado

para a produção de plantas transgênicas (Zuo et al., 2000). Constructos para a expressão destes genes bem como um gene reporter (β -glucuronidase ou proteína verde fluorescente) foram produzidos sob o controle dos três promotores, deste modo produzindo um total de 12 constructos. Linhagens transgênicas foram obtidas por transformação de plantas de *Arabidopsis* com os constructos correspondentes por imersão floral. Com a exceção de pyk10:At1g47960, todos os experimentos de transformação deram origem a linhagens transgênicas independentes. Plantas transgênicas controle correspondentes foram, além disso, produzidas por transformação de plantas selvagens com os plasmídeos vazios correspondentes (pBINHygTX, para expressão específica para raiz, e pER8, para expressão indutível por esteroide), embora não tenham sido usados nas caracterizações descritas aqui. Ao invés, plantas de *Arabidopsis* selvagem Col0 foram usadas para comparação com nossas plantas transgênicas.

15 **Construção de plasmídeo**

Inibidores de invertase da parede celular (At5g46940) e vacuolares (At1g47960) putativos foram inicialmente clonados em pBluescript SK+, entre sítio Acc65I e XbaI. Os produtos de PCR correspondentes, obtidos por uso de primers específicos contendo sítios de restrição para as etapas de clonagem subsequentes (Acc65I e XhoI para o primer 5' e ApaI e XbaI para o primer 3'), foram digeridos com Acc65I e XbaI e clonados em pBluescript dando origem a pmcg2 e pmcg3 (Fig. 15) respectivamente (planilhas de plasmídeos (PDS) MCG-4 (Fig. 16) e 5 (Fig. 17)).

Foram usados os seguintes primers:

25 Atcwinh-1: 5'-ctgaggtacctcgagcctgaaatggcttctctc-3'
 Atcwinh-2: 5-ctgatctagagggccctcattcaacaaggcgatc-3'
 Atvinh-1: 5'-ctgaggtaccctcgagaagatgaagatgatgaagg-3'
 Atvinh-2: 5'-gatctctagagggccctcaaagcaacattctcac-3'

30 Mais especificamente, e com referência à Fig. 16, o cDNA codificando para um inibidor de invertase da parede celular de *Arabidopsis thaliana* (At5g46940) foi amplificado a partir de RNA isolado de folhas por uso dos primers Atcwinh-1 (5'-

CTAGGGTACCTCGAGCCTGAAATGGCTTCTTCTC-3'), e Atwinh-2 (5'-CTGATCTAGAGGGCCCTCATTCAACAAGGCGATC-3'), que geraram os sítios de restrição *Acc65I/XhoI* e *XbaI / ApaI* na extremidade 5' e 3', respectivamente. O produto gerado foi cortado com *Acc65I* e *XbaI* e clonado entre os sítios correspondentes do plasmídeo de clonagem pBluescript KS(+), gerando o plasmídeo pmcg2.

Além disso, e com referência à Fig. 17, o cDNA codificando para um inibidor de invertase vacuolar de *Arabidopsis thaliana* (At1g47960) foi amplificado a partir de RNA isolado de folhas por uso dos primers Atvinh-1 (5'-CTGAGGTACCTCGAGAAGATGAAGATGATGAAGGT-3'), e Atvinh-2 (5'-GATCTCTAGAGGGCCCTCAAAGCAACATTCTCAC-3'), os sítios de restrição gerados *Acc65I/XhoI* e *XbaI / ApaI* na extremidade 5' e 3', respectivamente. O produto gerado foi cortado com *Acc65I* e *XbaI* e clonado entre os sítios correspondentes do plasmídeo de clonagem pBluescript KS(+), gerando o plasmídeo pmcg3.

Primeiros constructos para uma expressão específica para raiz do inibidor de invertase usaram o promotor *pyk10* específico para raiz de uma mirosinase de *Arabidopsis*. O promotor *Pyk10* foi primeiro amplificado por PCR de DNA genômico, isolado de folhas de *Arabidopsis*, com os primers *pyk10-FORW* e *pyk10-REV*. O produto desta primeira reação de PCR foi usado para uma reação de PCR aninhado com os primers *pyk10-C* e *pyk10-F2*, designado como em Nitz et al. (2001), contendo sítios de restrição *Acc65I*. O produto de PCR final foi restringido com *Acc65I* e clonado em pTF2-6 (inibidor de invertase da parede celular de *Nicotiana tabacum* em pBINHygTx), dando origem a pmb1 (PDS MCG-3 (Fig. 18)). Foram usados os seguintes primers:

pyk10-FORW: 5'-gatgtacacgttttggtgtggg-3'

pyk10-REV: 5'-gcttacgtgttagggaaatgg-3'

pyk10-C: 5'-ggacggtaccctgcaacgaagtgtacc-3'

pyk10-F2: 5'-gcaggtaccgtaattctgattttattcaag-3'

Mais especificamente, e com referência à Fig. 18, um constructo para expressão específica para raiz de inibidor de invertase da parede celu-

lar de *Nicotiana tabacum* foi gerado em duas etapas. O promotor do gene *pyk10* (AJ292756; Nitz et al., 2001), codificando para uma mirosinase específica para raiz, foi amplificado por duas reações de PCR seqüenciais. Na primeira reação, os primers *pyk10-FORW* (5'-GATGTACACGTTTTGGTGTGGG-3') e *pyk10-REV* (5'-GCTTACGTGTT-TAGGGAAATGG -3') foram usados para amplificação de DNA genômico isolado de folhas de *Arabidopsis thaliana*. O produto desta reação foi usado em uma reação de PCR aninhado com os primers *pyk10-C* (5'-GGACGGTACCCTGCAACGA AGTGTACC -3') e *pyk10-F2* (5'-GCAGGTACCGTAATTCTGATTTTATTCAAG-3'), ambos contendo um sítio de restrição *Acc65I*. O produto desta reação de PCR foi cortado com *Acc65I* e clonado no sítio correspondente do plasmídeo pTF2-6, o qual correspondeu a um inibidor de invertase da parede celular (Y12805) clonado no plasmídeo binário pBINHygTx (Gatz e Lenk, 1998) entre os sítios de restrição *Acc65I* e *XbaI*. A orientação correta do promotor em pmb1 foi verificada por restrição com diferentes enzimas.

Para a expressão dos inibidores de invertase sob controle do promotor *pyk10*, At5g46940 e At1g47960 foram cortados de pmcg2 e pmcg3, respectivamente, e clonados em pTF2-6 por restrição com *Acc65I* e *XbaI*, dando origem a pmcg4 (Fig. 19) e pmcg5 (Fig. 20) (PDS MCG-6 (Fig. 21) e MCG-7 (Fig. 22)). O promotor foi inserido na frente dos genes em ambos os constructos por digestão de pmb1 com *Acc65I*, isolamento do fragmento promotor *pyk10* e clonagem em *Acc65I* restrito pmcg4 e pmcg5, produzindo pmcg6 (Fig. 23) e pmcg7 (Fig. 24) (PDS MCG-8 (Fig. 25) e MCG-9 (Fig. 26)).

Mais especificamente, e com referência à Fig. 21, o cDNA codificando para um inibidor de invertase da parede celular de *Arabidopsis thaliana* (At5g46940) foi cortado do plasmídeo pmcg2 por restrição com *Acc65I* e *XbaI*, e clonado entre os sítios correspondentes de pTF2-6. Para isto, o plasmídeo pTF2-6 foi primeiro cortado com estas enzimas e a banda correspondente ao plasmídeo binário pBINHygTx foi isolada. Foi gerado o plasmídeo pmcg4, correspondente a um inibidor de invertase da parede celular

cDNA de *Arabidopsis thaliana* em pBINHygTx.

Mais especificamente, e com referência à Fig. 22, o cDNA codificando para um inibidor de invertase vacuolar de *Arabidopsis thaliana* (At1g47960) foi cortado do plasmídeo pmcg3 por restrição com *Acc65I* e *XbaI*, e clonado entre os sítios correspondentes de pTF2-6. Para isto, o plasmídeo pTF2-6 foi primeiro cortado com estas enzimas e a banda correspondentes ao plasmídeo binário pBINHygTx foi isolada. Foi gerado o plasmídeo pmcg5, correspondente a um cDNA de inibidor de invertase vacuolar de *Arabidopsis thaliana* em pBINHygTx.

Mais especificamente, e com referência à Fig. 25, o constructo para a expressão específica para raiz de um inibidor de invertase da parede celular de *Arabidopsis thaliana* (At5g46940) no plasmídeo binário pBINHygTx foi gerado em duas etapas. O primeiro promotor *pyk10* foi cortado de pmb1 com *Acc65I* e isolado de um gel agarose. O promotor foi clonado entre os sítios correspondentes de pmcg4, para gerar pmcg6.

Mais especificamente, e com referência à Fig. 26, um constructo para a expressão específica para raiz de um inibidor de invertase vacuolar de *Arabidopsis thaliana* (At1g47960) no plasmídeo binário pBINHygTx foi gerado em duas etapas. O primeiro promotor *pyk10* foi cortado de pmb1 com *Acc65I* e isolado de um gel agarose. O promotor foi clonado entre os sítios correspondentes de pmcg5, para gerar pmcg7.

O promotor críptico foi amplificado por PCR de plasmídeo X7-KS, proporcionado por Mollier et al. (2000), por uso de primers cryp-F/R, contendo um sítio de restrição *Acc65I* em ambas as extremidades. O fragmento de PCR foi clonado em pmcg6-1 (*pyk10:At5g56940* no plasmídeo pBINHygTx) dando origem a pmcg11 (Fig. 27) (PDS MCG-13 (Fig. 28)). Para a produção de uma fusão de promotor críptico a At1g47960, o fragmento de PCR descrito acima para o promotor foi restrito com *Acc65I* e clonado em pmcg7-5 (*pyk10:At1g47960* e, pBINHygTx) dando origem a pmcg12 (Fig. 29) (PDS MCG-14 (Fig. 30)). Em ambos os plasmídeos o promotor *pyk10* presente em pmcg6 e pmcg7 foi removido por restrição com *Acc65I* e isolamento da banda de plasmídeo.

Foram usados os seguintes primers:

cryp-F: 5'-gatcgggtacctcgaattgtgatattgtaagc-3'

cryp-R: 5'-catgggggtaccctgattaattagcaattagtg-3'

Mais especificamente, e com referência à Fig. 28, um constructo
 5 para expressão específica para raiz de um inibidor de invertase da parede
 celular de *Arabidopsis thaliana* (At5g46940) foi gerado em duas etapas. O
 promotor de um gene críptico específico para raiz (AX063411) foi amplifica-
 do por PCR usando os primers cryp-F (5'-GATCGGTACCTCGAATTGTGA-
 TATATTGTAAGC-3') e cryp-R (5'-
 10 CATGGGGTACCCTGATTAATTAGCAATTAGTGG-3'), ambos contendo um
 sítio de restrição *Acc65I*, do plasmídeo X7-KS proporcionado por Mollier et
 al. (2000). O produto desta reação de PCR foi cortado com *Acc65I* e clonado
 no sítio correspondente de pmcg6. pmcg6 foi primeiro cortado e a banda
 correspondente ao plasmídeo pBINHygTx contendo o inibidor de invertase
 da parede celular isolado de um gel agarose. A orientação correta do promo-
 15 tor em pmcg11 foi verificada por restrição com diferentes enzimas.

Mais especificamente, e com referência à Fig. 30, um constructo
 controle para uma expressão indutível por estrógeno da proteína verde fluo-
 rescente reporter (GFP) foi obtido da Dirk Becker (Lehrstuhl für Pflanzenphy-
 siologie und Pflanzenbiophysik, Universität Würzburg) e transformado em
 20 *Agrobacterium* para usá-lo para transformação vegetal.

Os constructos correspondentes em um sistema indutível por
 estrógeno, pmcg8 (Fig. 31) e pmcg9 (PDS MCG-10 (Fig. 32) e MCG-11 (Fig.
 33)) foram obtidos por restrição do plasmídeo pER8 e pmcg2 ou pmcg3 com
 25 *XhoI* e *Apal* e ligação do plasmídeo digerido ao fragmento isolado corres-
 pondente ao gene.

Mais especificamente, e com referência à Fig. 32, um constructo
 para uma expressão, indutível por estrógeno, de um inibidor de invertase da
 parede celular de *Arabidopsis thaliana* (At5g46940) foi gerado por isolamen-
 30 to do cDNA correspondente de pmcg2, por restrição com *XhoI* e *Apal*, e clo-
 nagem entre os sítios correspondentes do plasmídeo binário pER8.

Mais especificamente, e com referência à Fig. 33, um constructo

para uma expressão, indutível por estrógeno, de um inibidor de invertase vacuolar de *Arabidopsis thaliana* (At1g47960) foi gerado por isolamento do cDNA correspondente de pmcg3, por restrição com *XhoI* e *Apal*, e clonagem entre os sítios correspondentes do plasmídeo binário pER8.

- 5 Vide também Molier et al. (Mollier et al.(2000). Tagging of a cryptic promoter that confers root-specific gus expression in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Rep. 19, 1076-1083.); Nitz I. et al. (Nitz I., Berkefeld H., Puzio P.S. and Grundler F.M.W. (2001). *Pyk10*, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci. 161, 337-346.); and
- 10 Zuo J. et al. (Zuo J., Niu Q.W. and Chua N.H. (2000). An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. Plant J. 24, 265-273.)

Exemplo 2: Crescimento de plantas transgênicas em meio de cultura contendo 1% de sacarose

- 15 Caracterização inicial das linhagens transgênicas geradas conforme descrito no exemplo 1, foi feita com plantas crescendo em vidros Weck contendo meio MS mais vitaminas, MES, sacarose a 1% e gelrita a 0,3% para polimerização. As mudas foram pré-cultivadas primeiro em meio de seleção com a mesma composição, mas contendo glucose a 1% ao invés
- 20 de sacarose e incluindo 50 mg/L de higromicina para seleção de transgênicas mas não para plantas controle selvagens. Depois de aproximadamente 14 dias de crescimento, as mudas foram transferidas para o meio de cultura descrito acima.

- 25 Mais especificamente, sementes de *Arabidopsis* foram pré-cultivadas em meio MS0222 contendo 0,5g/L de MES, 1% de glucose e 0,3% de gelrita, e incluindo higromicina no caso de seleção para mudas transgênicas. Depois de 14 dias, as mudas foram transferidas para vidros Weck contendo um meio similar mas com sacarose a 1% ao invés de glucose e sem antibiótico. O peso fresco de broto e raiz foram quantificados e a
- 30 proporção de broto para raiz foi determinada para 6 plantas de cada linhagem independente. WTC010, *Arabidopsis* selvagem; AT4-11, *pyk10:At5g46940*; AT10-3 e 20, *cryptic:At5g46940*; AT11-9A, *cryp-*

tic:At1g47960; AT15, *pyk10:Cin1*. Para os experimentos de *Northern blot*, RNA foi extraída das raízes de cada planta individual de modo independente.

A quantificação do peso fresco de broto e raiz na planta mostraram que, interessantemente, a inibição da atividade de invertase na raiz não resultou em uma redução do peso da raiz mas em um peso não alterado ou ligeiramente aumentado, acompanhado por um aumento mais acentuado no peso do broto essencialmente devido a um aumento no número de folhas e brotos de roseta. Portanto, proporção de broto para raiz e biomassa vegetal inteira foi aumentada nas plantas inibidoras de invertase. O efeito da expressão de inibidor de invertase sobre a proporção de broto para raiz e o fenótipo da planta foi mais evidente no caso de expressão orientada por promotor críptico conforme representado na Fig. 3, muito embora a expressão genética fosse claramente mais reforçada com o promotor *pyk10* conforme representado na Fig. 4.

Mais especificamente, a Fig. 3 representa a distribuição normal da proporção de broto para raiz em plantas selvagens (WT) e as diferentes linhagens transgênicas, a Fig. 4 mostra expressão de RNA, determinada por *Northern blot*, dos inibidores de invertase correspondentes em raízes de plantas transgênicas em comparação com plantas selvagens controle, e a Fig. 5 mostra expressão de RNA de *Cin1* em raízes de plantas transgênicas.

O aumento da atividade de invertase na raiz pela expressão tecido específica de um gene de invertase (*Cin1*) resultou em uma alta variabilidade de crescimento entre plantas da mesma linhagem transgênica, não proporcionando um fenótipo claro em comparação com plantas selvagens. No entanto, em plantas cultivadas no meio de cultura foi observada uma diferença no fenótipo em comparação com plantas de controle, com um aumento da biomassa de raiz ($0,33 \pm 0,21$ em relação a $0,19 \pm 0,08$) e broto ($1,50 \pm 0,50$ em relação a $1,00 \pm 0,25$) para uma extensão similar, portanto não produzindo uma grande diferença na proporção de broto para raiz em relação a plantas de controle (Fig. 3). Nesta condição de crescimento, também houve algum grau de variabilidade no fenótipo de plantas transgênicas,

algumas das mesmas apresentando proliferação anormal de estruturas verdes semelhantes a calos indiferenciados ao invés de folhas diferenciadas e não florescendo, ao passo que outras floriram e apresentaram um número aumentado de folhas diferenciadas (não mostrado). Estas estruturas também aparecem em alguns das plantas inibidoras de invertase, embora folhas e inflorescências apropriadas tenham se desenvolvido nestas plantas também. Formação prejudicada de órgão apropriado, levando ao aparecimento de estruturas verdes pobremente diferenciadas, foi previamente descrita em embriões de cenoura anti-sentido de invertase cultivados sobre meio contendo sacarose. Este efeito foi atribuído à sinalização errônea produzida pelo nível alterado de sacarose para hexose nas plantinhas, uma vez que pode ser compensado pela adição de glucose e frutose, os produtos da reação de invertase (Tang et al., 1999). Quando plantas *pyk10:Cin1* foram cultivadas em diferentes condições (solo ou perlita) foi observada uma maior variabilidade no fenótipo das plantas. Em alguns casos as plantas apresentaram uma aumentada proporção de broto para raiz, ao passo que outras plantas da mesma linhagem apresentaram uma proporção reduzida. Em consequência, o desvio padrão calculado para a proporção de broto para raiz das plantas independentes em um único experimento de caracterização foi em alguns casos tão elevado quanto o valor médio. Esta variação pode ser atribuível a uma degradação do mensageiro correspondente na planta, conforme observado por estudos por *Northern blot* para plantas cultivadas em meio de cultura (Fig. 5).

Exemplo 3: Crescimento de plantas transgênicas em perlita

Em um segundo experimento de caracterização, as plantas foram cultivadas em perlita e irrigadas com solução de Hoagland durante 36 dias em condições de dia longo (16 horas de luz / 8 horas de escuridão), depois do pré-crescimento inicial em placas de seleção. O peso fresco de raiz e broto e a proporção de broto para raiz, bem como o peso de semente por planta foram determinados para as diferentes linhagens em estudo. Mais especificamente, sementes de *Arabidopsis* foram pré-cultivados em meio de seleção por 14 dias e em seguida transferidas para perlita e cultiva-

das por 36 dias em condições de dia longo. O peso fresco de broto e raiz foi quantificado e a proporção de broto para raiz foi determinada para 8 plantas de cada linhagem independente. WTCol0, *Arabidopsis* selvagem; AT4-11, *pyk10:At5g46940*; AT10-3, 6.2 e 20, *cryptic:At5g46940*; AT11-3, 7 e 9A, *cryptic:At1g47960*; AT15, *pyk10:Cin1*.

Os resultados são mostrados na Fig. 6.

Conforme pode ser visto a partir da Fig. 6, plantas da linhagem transgênica *pyk10:Cin1* agiram de um modo diferente com respeito ao experimento anterior. A proporção de broto para raiz estava aumentada nestas plantas, o peso fresco da raiz estava reduzido ($0,017 \pm 0,007$ em relação a $0,038 \pm 0,027$ em plantas selvagens) e o peso fresco de broto ligeiramente aumentado ($0,20 \pm 0,09$ em relação a $0,16 \pm 0,07$ em plantas selvagens) em relação a plantas controle. Para o inibidor de invertase, expressão de inibidor de invertase, orientada por *pyk10*, resultou em uma tendência mais clara para uma aumentada proporção de broto para raiz do que no meio de cultura, embora o aumento fosse novamente mais claro em linhagens onde a expressão do inibidor de invertase estava sob controle do promotor críptico (Fig. 6).

O aumento desta proporção foi essencialmente devido a um peso fresco de broto aumentado nestas linhagens, como um resultado de um número de broto aumentado, ao passo que a massa de raiz foi somente aumentada em uma das linhagens (AT11-3) analisadas para *cryptic:At1g47960*, mas não nas outras linhagens independentes para o mesmo constructo. De modo interessante, a análise do peso de semente por planta também mostrou uma importante diferença entre produção de sementes de plantas transgênicas e selvagens. A produção de sementes estava claramente aumentada nas diferentes linhagens de inibidor de invertase, ao passo que na linhagem *pyk10:Cin1* estava ligeiramente reduzida com respeito ao controle apesar do ligeiro aumento na biomassa de broto (Tabela 3).

Tabela 3: Teste de alcance múltiplo de Duncan para valores médios de plantas: As plantas são agrupadas em grupos de importância designados por uma letra. As linhagens com a mesma letra não são significativamente diferentes.

| | Linhagem | Peso fresco de raiz (g) | Peso fresco de broto (g) | Broto / raiz | Peso de semente (mg) / planta | |
|----|-----------|-------------------------|--------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|
| | WTCol00 | 0,038750 bcd | 0,158750 d | 4,722500 e | 4,712500 ef | |
| | AT150 | 0,016875 d | 0,203750 d | 12,271250 bc | 2,462500 f | |
| 10 | AT4-110 | 0,063750 b | 0,630000 bc | 10,526251 cd | 13,425000 bcd | |
| | AT10-30 | 0,056250 bc | 0,671250 b | 12,902500 bc | 17,562500 b | |
| | AT10-6,20 | 0,046250 bcd | 0,337500 d | 7,753750 de | 12,049999 cd | |
| | AT10-200 | 0,026875 cd | 0,408750 cd | 15,785000 ab | 16,600000 bc | |
| | AT11-30 | 0,108750 a | 1,318750 a | 13,961250 abc | 8,705000 de | |
| 15 | AT11-70 | 0,044375 bcd | 0,755000 b | 17,344999 a | 27,634998 a | |
| | AT11-9A0 | 0,062500 b | 0,778750 b | 13,515000 abc | 23,212500 a | |
| | | Coef. Var. | 57,292% | 39,766% | 32,203% | 35,891% |

O fenótipo mais claro, com respeito a produção de semente e proporção de broto para raiz, foi obtido nas linhagens expressando AtC/VIF1 (At1g47960) sob o controle do promotor críptico. Portanto estas linhagens, designadas como AT11, foram usadas para uma caracterização detalhada. Duas linhagens independentes para este constructo (AT11-7 e AT11-9), que continham diferente número de cópias e sítios de inserção, conforme mostrado por experimentos de *Southern blot* (Fig. 7), foram usadas para as caracterizações detalhadas.

Para preparar o *Southern blot* de três linhagens independentes para AT11 (*cryptic:At1g47960*), 2 µg de gDNA de cada linhagem foram digeridos com enzimas de restrição *Bam*HI (B), *Eco*RI (E), *Hind*III (H) e *Xba*I (X) que não cortam dentro da seqüência de sonda. DNA digerido foi analisado por eletroforese em 0,7% de gel agarose e manchado sobre uma membrana de nitrocelulose. O filtro foi hibridizado com uma sonda marcada radioativa

correspondente ao gene *HPTII*.

Como um experimento de caracterização final, as plantas foram cultivadas nas condições previamente descritas, em perlita durante aproximadamente 49 dias em condições de dia longo (16 horas de luz / 8 horas de escuridão). Neste caso, o pré-crescimento foi feito em meio de seleção contendo sacarose a 1% ao invés de glucose, para estudar a influência do açúcar neste meio sobre o crescimento subsequente das plantas. O tempo de crescimento foi aumentado de 36 para 49 dias para analisar se as diferenças entre linhagens são mais claras depois de períodos de crescimento mais longos. Novamente, o peso fresco de raiz e broto e a proporção de broto para raiz foram determinados para as diferentes linhagens em estudo, mas neste caso os valores para produção de sementes correspondem a peso seco de siliqua. A principal diferença entre este experimento e o experimento precedente é que plantas AT15 (*pyk10:Cin1*) têm comportamento mais similar a plantas selvagens, com uma proporção de broto para raiz mais similar a plantas selvagens do que no experimento anterior (Fig. 8). Novamente, o aumento desta proporção em linhagens de inibidor de invertase foi devida a um peso fresco de broto aumentado. Somente foi observada uma redução no peso fresco da raiz em relação a plantas de controle em AT10-20 (*cryptic:At5g4694*), acompanhada por um peso de broto ligeiramente reduzido em relação a plantas selvagens, mas com uma aumentada proporção de broto para raiz. Em todas as outras linhagens analisadas, a proporção de broto para raiz foi aumentada em relação ao controle, embora para AT15 as diferenças com WTCol0 não fossem estatisticamente significantes de acordo com o teste de Duncan (Tabela 4).

Para semelhante finalidade, sementes de *Arabidopsis* foram pré-cultivadas conforme descrito anteriormente, exceto que a glucose foi substituído por sacarose a 1%, e em seguida transferidas para perlita e cultivadas por 49 dias em condições de dia longo. O peso fresco de broto e raiz foram quantificados e a proporção de broto para raiz foi determinada para 7 plantas de cada linhagem independente. WTCol0, *Arabidopsis* selvagem; AT4-11, *pyk10:At5g4694*; AT10-6.2 e 20, *cryptic:At5g4694*; AT11-7 e 9A, *cryptic*.

tic:At1g47960, AT15, *pyk10:Cin1*.

Com respeito à produção de semente, determinada como peso seco de siliqua por planta, linhagens de inibidor de invertase mostraram um aumento significativo deste parâmetro. Neste caso, plantas AT15
5 (*pyk10:Cin1*) mostraram um aumento ligeiro, mas não estatisticamente significativo, da produção de semente com respeito ao tipo selvagem. A diferença fenotípica mais acentuada foi novamente observada para a expressão de inibidor de invertase orientada por promotor críptico, ao passo que diferenças para controle não foram tão acentuadas com o promotor *pyk10*. As li-
10 nhagens AT11-7 e AT11-9A foram novamente as linhagens apresentando a diferença mais significativa, na proporção de broto para raiz e produção de sementes, em relação aos controles.

Tabela 4: Test de alcance múltiplo de Duncan para valores médios de plantas: As plantas são agrupadas em grupos de significância designados por uma letra. As linhagens com a mesma letra não são significativamente diferentes.
15

| | Linhagem | Peso fresco de raiz (g) | Peso fresco de broto (g) | Broto / raiz | Peso seco de siliqua (mg)/planta |
|-------|------------------|-------------------------|--------------------------|----------------|----------------------------------|
| 20 | WTCol00,137143 | ab | 0,980429 cd | 6,892000 c | 20,857143 c |
| | AT150,204286 | a | 2,257143 ab | 11,454286 bc | 45,571429 bc |
| | AT4-110,101429 | bc | 1,580000 bc | 15,611428 ab | 44,714286 bc |
| | AT10-6,20,102857 | bc | 1,547143 bc | 16,541429 ab | 66,571429 b |
| | AT10-200,061429 | c | 0,704286 d | 12,191428 b | 46,571429 bc |
| 25 | AT11-70,181429 | a | 2,867143 a | 18,045714 a | 122,285714 a |
| | AT11-9A0,147143 | ab | 2,425714 a | 17,930000 a | 111,571429 a |
| ----- | | | | | |
| | | Coef. Var. | 47,798% | 37,007% | 31,532% 51,972% |

30 Para semelhante finalidade, sementes de *Arabidopsis* foram pré-cultivadas em meio de seleção contendo sacarose por 14 dias e em seguida transferidas para perlita e cultivadas por 49 dias em condições de dia longo. O peso fresco de broto e raiz foram quantificados e a proporção de broto

para raiz foi determinada para 7 plantas de cada linhagem independente. O peso de siliqua por planta foi determinado uma vez que as síliquas estavam secas. WTCol0, *Arabidopsis* selvagem; AT4-11, *pyk10:At5g46940*; AT10-6.2 e 20, *cryptic:At5g46940*; AT11-7 e 9A, *cryptic:At1g47960*; AT15, *pyk10:Cin1*.

5 Como um exemplo do fenótipo das linhagens de inibidor de invertase, fotografias de AT11-7 e 9A são mostradas na Fig. 9, correspondendo ao último experimento de caracterização descrito. As imagens mostram que plantas das linhagens transgênicas são maiores e têm um número maior de folhas e brotos do que as plantas selvagens. Embora o peso de broto este-
10 seja aumentada em plantas das linhagens transgênicas, o aumento na produção de semente não é somente devido à massa de broto aumentada mas além disso o número de siliqua e conseqüentemente o peso de siliqua por peso fresco de broto está aumentado. Como um exemplo, no experimento analisado na Tabela 4, o peso seco de siliqua (mg)/ peso fresco de broto (g)
15 foi aumentado de 21,28 em plantas selvagens para 42,76 e 46,10 em AT11-7 e AT11-9A respectivamente. Por esta razão, nós determinamos em um experimento independente o número de siliqua por peso fresco de broto em plantas selvagens e transgênicas pré-cultivadas em placas de glucose, nos-
20 sas condições de pré-crescimento de rotina, e subseqüentemente cultivadas em perlita por 40 dias. Os resultados do teste de Duncan para estes dois parâmetros são mostrados na Tabela 5.

25 Tabela 5: Teste de alcance múltiplo de Duncan para valores médios das plantas: As plantas são agrupadas em grupos de significância designados por uma letra. As linhagens com a mesma letra não são significativamente diferentes.

| Linhagem | Número de siliqua / peso fresco de broto | Peso seco de siliqua (mg) / peso fresco de broto (g) |
|-----------|--|--|
| WTCol0 | 38,215497 b | 19,277501 c |
| 30 AT11-7 | 61,655353 a | 45,408005 a |
| AT11-9A | 54,039001 a | 32,318250 b |

 Coef. Var. 27,16% 43,15%

Para semelhante finalidade, sementes de *Arabidopsis* foram pré-cultivadas em meio de seleção contendo glucose por 14 dias e em seguida transferidas para perlita e cultivadas por 40 dias em condições de dia longo. O número e o peso seco de siliqua foram quantificados, e o número de siliqua / peso fresco de broto e peso seco de siliqua / peso fresco de broto foram determinados para 20 plantas de cada linhagem independente. O peso seco de siliqua foi determinado uma vez que as síliquas estavam secas.

10 WTCol0, *Arabidopsis* selvagem; AT11-7 e 9A, *cryptic:At1g47960*; AT15, *pyk10:Cin1*.

Na Fig. 9 o fenótipo de plantas independentes de WTCol0, AT11-7 e AT11-9A. Para semelhante finalidade, plantas de *Arabidopsis* foram pré-cultivadas em meio de seleção contendo sacarose e transferidas para perlita depois de 14 dias. Foram obtidas fotografias depois de 49 dias de crescimento em condições de dia longo, no momento da coleta do material da planta.

15

Exemplo 4:Fenótipo de plantas transgênicas em outras condições de crescimento

De modo a estudar se o fenótipo das linhagens transgênicas foi associado às condições de crescimento particulares usadas nos experimentos de caracterização, as plantas foram cultivadas em diferentes condições de crescimento e o fenótipo foi analisado em termos de peso fresco de broto e da raiz, proporção de broto para raiz e produção de sementes. Plantas das duas linhagens transgênicas selecionadas, AT11-7 e AT11-9A, e plantas Col0 selvagens foram cultivadas em condições de dia longo no solo, condições de dia curto em perlita e as condições previamente descritas, condições de dia longo em perlita, para comparação.

20

25

1.Crescimento das plantas em perlita e condições de dia curto

Para a análise do fenótipo da planta em condições de dia curto (8 h de luz/16 h de escuridão), as sementes foram pré-cultivadas em meio de seleção com glucose por 14 dias em condições de dia longo, e em segui-

30

da transferidas para perlita em condições de dia curto por 43 dias. Nesta hora foram medidos o peso fresco de broto e de raiz e a produção de semente. Conforme mostrado na Fig. 10 (Foram obtidas fotografias depois de 43 dias de crescimento em condições de dia curto, no momento da coleta de material da planta. 10 plantas de cada linhagem foram usadas neste experimento). Plantas das duas linhagens transgênicas em análise são ligeiramente maiores e têm um número aumentado de folhas em relação aos tipos selvagens. Além disso, uma alta percentagem das plantas transgênicas floresceu (100% em AT11-7 e 70% de AT11-9A) e apresentou algumas siliquas, ao passo que somente 40% das plantas selvagens floresceram e apresentaram um número reduzido de siliquas.

A análise estatística foi difícil de realizar devido à alta variabilidade do número e do peso fresco de siliqua entre plantas da mesma linhagem. No entanto, a proporção de broto para raiz foi aumentada de $12,73 \pm 2,62$ em tipos selvagens para $17,80 \pm 4,18$ e $15,06 \pm 3,30$ em AT11-7 e AT11-9A respectivamente. Este aumento foi significativo de acordo com o teste de Duncan. O número de siliqua por peso fresco de broto foi $2,04 \pm 2,69$ em tipos selvagens, $12,98 \pm 7,06$ e $5,60 \pm 6,42$ em AT11-7 e AT11-9A respectivamente, considerando todas as plantas. A alta variabilidade no tipo selvagem e AT11-9A foi devida à presença de algumas plantas que não tinham produzido qualquer siliqua no momento analisado. A análise de períodos de crescimento mais longos pode resultar em uma diferença mais clara no fenótipo, revelando diferenças na produção de sementes entre o tipo selvagem e transgênicas uma vez que todas as plantas floriram, e possibilitando uma análise estatística mais confiável dos diferentes parâmetros em estudo.

2.Crescimento de plantas no solo e em condições de dia longo

Plantas cultivadas sobre o solo em condições de dia longo (16 horas de luz / 8 horas de escuridão) apresentaram crescimento acelerado com relação a perlita e portanto o tempo de crescimento para a análise fenotípica foi reduzido para 30 dias. Plantas transgênicas apresentaram crescimento reduzido em comparação com plantas cultivadas com perlita, com

uma extensão ligeiramente reduzida com relação a plantas selvagens e aumentada ramificação de brotos, mas ainda foi observada uma diferença na proporção de broto para raiz em relação aos tipos selvagens (Fig. 11: Fenótipo de plantas de WTCol0, AT11-7 e AT11-9A. Plantas de *Arabidopsis* foram pré-cultivadas em meio de seleção contendo glucose e transferidas para perlita depois de 14 dias. Foram obtidas fotografias depois de 30 dias de crescimento em condições de dia longo, no momento da coleta do material da planta. Foram analisadas 6 plantas de cada uma das linhagens em estudo.). Esta diferença foi essencialmente devida a um peso das raízes significativamente reduzido em relação às plantas selvagens e um peso de broto não alterado significativamente (Tabela 6). Não obstante, estes dados devem ser cuidadosamente considerados, uma vez que a recuperação das raízes do solo é difícil em comparação com a perlita e pode ocorrer alguma perda de material durante a coleta das raízes.

A análise dos dados de acordo com o teste de Duncan mostrou que embora não houvesse variação significativa do número ou peso de siliqua por planta entre tipos selvagens e transgênicos, o número e o peso fresco de siliqua por grama de peso fresco de broto foi significativamente aumentado, sendo aproximadamente duas vezes o valor obtido em plantas selvagens (Tabela 6).

Tabela 6: Teste de alcance múltiplo de Duncan para valores médios de plantas: As plantas são agrupadas em grupos de significância designados por uma letra. As linhagens com a mesma letra não são significativamente diferentes.

| Linhagem | Peso fresco de raiz (g) | Peso fresco de broto (g) | Broto / raiz | nº de Siliqua / Peso fresco de broto | Peso fresco de Siliqua (mg) / Peso fresco de broto (g) |
|----------|-------------------------|--------------------------|--------------|--------------------------------------|--|
|----------|-------------------------|--------------------------|--------------|--------------------------------------|--|

5

| | | | | | |
|---------|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| WTCol0 | 0,186000 a | 1,688333 a | 9,848333 b | 21,060000 b | 67,346670 b |
| AT11-7 | 0,075000 b | 1,310000 ab | 17,589999 a | | 43,741664 a |
| | | | | | 148,926666 a |
| AT11-9A | 0,065000 b | 0,948333 b | 16,048333 a | | 45,190002 a |
| | | | | | 158,349996 a |

10

Coef. Var. 42,75% 28,58% 34,61% 33,90% 36,07%

15

20

Para semelhante finalidade, sementes de *Arabidopsis* foram pré-cultivadas em meio de seleção contendo glucose por 14 dias e em seguida transferidas para o solo e cultivadas por 30 dias em condições de dia longo. O número e o peso fresco de siliqua foram quantificados, e o número de siliqua / peso fresco de broto e peso fresco de siliqua / peso fresco de broto foram determinados para 6 plantas de cada linhagem independente. O peso fresco de siliqua foi determinado na hora da coleta. WTCol0, *Arabidopsis* selvagem; AT11-7 e 9A, *cryptic:At1g47960*.

25

Este experimento de caracterização mostra que embora o tamanho das plantas transgênicas seja reduzido no solo com relação às plantas selvagem, ao invés de aumentado conforme observado em perlita, a proporção de broto para raiz e a produção de sementes por peso fresco de broto ainda estão aumentados.

3.Crescimento de plantas em perlita e condições de dia longo

Como uma comparação para crescimento, plantas de WTCol0 e as duas linhagens transgênicas foram cultivadas como em experimentos anteriores. Mudanças pré-cultivadas em placas de seleção contendo glicose foram transferidas para perlita e cultivadas por 40 dias adicionais. Foram

5 determinados o peso fresco de broto, raízes e siliqua bem como o número de siliqua e os parâmetros correspondentes sob análise foram calculados (incluídos na Tabela 7). Para semelhante finalidade, sementes de *Arabidopsis* foram pré-cultivadas em meio de seleção contendo glicose por 14 dias e em seguida transferidas para perlita e cultivadas por 40 dias em condições

10 de dia longo. O peso fresco de broto e raízes foram medidos em 20 plantas de cada linhagem independente. O peso fresco de siliqua foi determinado na hora da coleta. WTCol0, *Arabidopsis* selvagem; AT11-7 e 9A, *cryptic:At1g47960*. Mais especificamente, sementes de *Arabidopsis* foram pré-cultivadas em meio de seleção contendo glicose por 14 dias e em seguida

15 transferidas para perlita e cultivadas por 40 dias em condições de dia longo. O número e peso fresco de siliqua por planta foram medidos na hora da coleta. WTCol0, *Arabidopsis* selvagem; AT11-7 e 9A, *cryptic:At1g47960*.

Tabela 7: Teste de alcance múltiplo de Duncan para valores médios de plantas: As plantas são agrupadas em grupos de significância designados por uma letra. As linhagens com a mesma letra não são significativamente diferentes.

| Linhagem | Peso fresco de raiz (g) | Peso fresco de broto (g) | Broto / raiz | nº de Siliqua / Peso fresco de broto | Peso fresco de Siliqua (mg) / Peso fresco de broto (g) |
|----------|-------------------------|--------------------------|--------------|--------------------------------------|--|
|----------|-------------------------|--------------------------|--------------|--------------------------------------|--|

5

| | | | | | |
|---------|------------|------------|-------------|-------------|--------------|
| WTCol0 | 0,034980 a | 0,420710 b | 11,864001 b | 58,289508 b | 147,127991 b |
| AT11-7 | 0,036720 a | 0,666105 a | 18,538249 a | 96,629999 a | 257,697510 a |
| AT11-9A | 0,042080 a | 0,787255 a | 20,966499 a | 87,278503 a | 266,290015 a |

10

Coef. Var. 51,34% 50,12% 26,75% 21,60% 21,84%

15

Conforme observados nos experimentos de caracterização anteriores, a proporção de broto para raiz foi significativamente aumentada em plantas transgênicas em relação aos tipos selvagens muito embora, conforme aconteceu com a caracterização em solo prévia, esta proporção fosse maior em plantas selvagens neste experimento do que em caracterizações anteriores com plantas cultivadas em perlita (Tabelas 3 e 4). Ainda o aumento na proporção de broto para raiz é devido ao aumentado peso fresco de broto em plantas transgênicas, ao passo que o peso fresco da raiz não foi significativamente alterado. Os valores do peso de broto em linhagens transgênicas foram comparáveis com os obtidos em experimentos de caracterização anteriores em condições similares (Tabela 3.1), mas no caso de plantas selvagens foi produzido um aumento em relação a outras caracterizações resultando no aumento mencionado na proporção de broto para raiz. Estes resultados também confirmam que o crescimento global das plantas está

20

25 aumentado tanto no tipo selvagem quanto nas linhagens transgênicas quando é feito pré-crescimento em placas de seleção contendo sacarose em re-

lação à glucose (vide dados na Tabela 3.4 em comparação com a Tabela 3 e 7).

Com relação à produção de sementes, foi observado um significativo aumento no número ou no peso fresco de siliqua por pero fresco de broto com respeito às plantas selvagens para as duas independent linhagens transgênicas sob análise (Tabela 7). Os aumentos com respeito ao tipo selvagem são proporcionais aos observados em um experimento anterior feito nas mesmas condições (vide a Tabela 5 para comparação), levando em conta que no experimento anterior foi determinado o peso seco de siliqua ao invés de peso fresco. Neste caso, muito embora não tenham sido mostrados os resultados, as alterações do peso fresco de siliqua por peso fresco de broto foram proporcionais às mostradas para peso seco na Tabela 5

Tabela 8: Teste de alcance múltiplo de Duncan para valores médios de plantas: As plantass são agrupadas em grupos de significância designados por uma letra. As linhagens com a mesma letra não são significativamente diferentes.

| Linhagem | nº de Siliqua / planta | Peso fresco de Siliqua (mg) / planta |
|-------------------|------------------------|--------------------------------------|
| WTCol0 | 23,350000 b | 60,274994 b |
| AT11-7 | 61,600000 a | 187,224976 a |
| AT11-9A | 66,900000 a | 211,472485 a |
| Coef. Var. | 46,81% | 56,06% |

O número e o peso fresco de siliqua por planta também estão aumentados em relação a tipos selvagens no experimento real (Tabela 7) de modo diferente das plantas cultivadas no solo, embora o aumento fosse menor do que em plantas pré-cultivadas em sacarose. O fenótipo das plantas é mostrado na Fig. 12 (Fenótipo das plantas de WTCol0, AT11-7 e AT11-9A depois de 40 dias de crescimento em condições de dia longo. Plantas de *Arabidopsis* foram pré-cultivadas em meio de seleção contendo glucose e transferidas para perlita depois de 14 dias. Foram obtidas fotografias depois de 40 dias de crescimento em condições de dia longo.)

Exemplo 5: Determinação de atividade de inibidor de invertase em raízes de plantas transgênicas

Conforme mostrado aqui, neste requerimento de patente, análise *Northern blot* demonstrou que efetivamente as linhagens transgênicas têm um aumento da expressão do inibidor de invertase correspondente com relação às plantas selvagens. Este aumento reflete o acúmulo de RNA mensageiro para o gene correspondente, mas não comprova a atividade da enzima sobre a inibição de invertases. A determinação da inibição da atividade de invertases em raízes pelo inibidor em um teste "in vitro" apresenta a dificuldade de que o teste geralmente é realizado em condições ótimas onde a concentração de açúcar não é a concentração real presente na raiz, além do efeito de proteção descrito da sacarose sobre inibição de invertase em uma concentração menor do que aquela usada na prova de atividade (Rausch e Greiner, 2004). Além disso, a determinação da atividade de invertase em um determinado estágio de crescimento pode não apresentar necessariamente diferenças entre tipos transgênicos e selvagens, devido à atividade espaço-temporal do promotor usado para orientar a expressão genética. Ao invés, alterações da atividade de invertase em estágios iniciais de desenvolvimento podem alterar o crescimento da planta e assimilar particionamento, resultando nos fenótipos observados. Além disso, Greiner et al. (1999) reportaram que a estabilidade dos complexos formados entre invertases e os inibidores durante a preparação pode depender de fatores tecido específicos. A análise de atividade de invertase vacuolar em plantas de batata transgênicas que expressaram ectopicamente um inibidor de invertase de tabaco mostrou uma reduzida atividade nas folhas mas não em tubérculos transgênicos (Greiner et al., 1999), muito embora os níveis de transcriptos de inibidor de invertase fossem claramente aumentadas em ambos os órgãos em relação a plantas controle. Este resultado foi explicado pelos autores com base em uma diferente estabilidade do complexo em tubérculos em relação às folhas. Por esta razão, a determinação dos níveis de proteína do inibidor de invertase por uso de um anticorpo específico seria de interesse. No entanto, até o momento não há bom anticorpo disponível. Portanto, nós agora temos por

objetivo obter anticorpos contra o inibidor de invertase por expressão heteróloga do *At1g47960* em *E.coli*.

Conforme previamente mencionado, dos dois inibidores de invertase de *Arabidopsis* usados nestes estudos AtC/VIF1 (*At1g47960*) inibe especificamente a atividade de invertase vacuolar em provas *in vitro*, ao passo que AtC/VIF2 (*At5g46940*) inibe ambas embora com uma maior afinidade para invertase vacuolar do que para invertase da parede celular (Link et al., 2004). No entanto, até o momento a localização intracelular destas proteínas não foi analisada. Como uma tentativa de analisar o efeito do inibidor de invertase sobre a atividade de invertase nas raízes, nós inicialmente medimos a atividade de invertase total em extratos de raízes de plantas selvagens e transgênicas das duas linhagens selecionadas, AT11-7 e AT11-9A (AtC/VIF1), e AT4-11 (AtC/VIF2). Os resultados mostraram que não houve variação significativa da atividade de invertase da parede celular entre as raízes de plantas controle e plantas transgênicas, nem tampouco para atividade de invertase vacuolar embora com um ligeiro aumento nas plantas de inibidor de invertase AtC/VIF1 (dados não mostrados). Conforme mencionado anteriormente, alguma dissociação do complexo formado entre a invertase e o inibidor correspondente pode ocorrer durante a preparação dos extratos e a estabilidade deste complexo pode depender de fatores tecido específicos presentes na raiz. De modo a evitar possíveis problemas de estabilidade do complexo durante o procedimento de isolamento, foi desenvolvida uma prova de extrato misto na qual uma alíquota de um extrato de raízes de uma planta transgênica foi misturado com uma alíquota de um extrato de folhas de uma planta selvagem. Esta mistura foi feita em um volume final de 570 μ l em tampão de fosfato pH 4,5, e incubada por 30 minutos a 37°C para a formação do complexo entre a invertase e o inibidor proteináceo. Depois da incubação, foi adicionada sacarose em uma concentração final de 5 mM e a reação foi incubada a 26°C durante 30 min, para degradação de sacarose mediada por invertase. Deste modo, a adição de sacarose depois da etapa de pré-incubação deve prevenir possível efeito de proteção da sacarose sobre a inibição da invertase (Weil et al., 1994; Greiner et al., 1998). Depois

da incubação, a reação foi interrompida em gelo e a glucose liberada foi medida por uso do reagente GOD (Roitsch et al., 1995). A atividade de invertase na mistura foi comparada com o valor adicionado do extrato de folhas e do extrato de raízes incubados separadamente. Embora somente tenham sido feitos até o momento testes preliminares, os resultados mostraram um efeito inibidor de invertase dos extratos de raízes transgênicas. Como um exemplo, a incubação da fração solúvel de um extrato de folhas com a fração solúvel de um extrato de raízes das linhagens *At1g47960* resultou em 79% de atividade de invertase com respeito ao valor adicionado. Para a fração solúvel de *At5g46940*, os valores na prova de extratos mistos foram 86% do valor adicionado dos extratos correspondentes. Em uma prova mista com um extrato de proteína solúvel de raízes selvagens o valor da atividade de invertase foi 123% do valor adicionado. Os resultados sugerem que efetivamente a atividade do inibidor de invertase está aumentada na fração solúvel de raízes transgênicas. Mas até o momento, devido à limitação de material disponível, não foram feitos testes com a fração da parede celular de material de raízes transgênicas.

Estes resultados sugeriram que as provas de extratos mistos podem ser um modo para determinar a atividade de inibidor de invertase em raízes de linhagens transgênicas. No entanto, a limitação do material de raízes disponível torna difícil melhorar as condições na prova. Como uma ferramenta para estabelecer a prova, foram usadas folhas de plantas de tabaco transgênicas expressando um inibidor de invertase apoplásmico (Greiner et al., 1998) sob controle de um promotor indutível de citocinina (*Lin6*), usadas no projeto de pesquisa previamente descrito sobre o papel da invertase sobre o retardo da senescência mediado por citocinina (Balibrea-Lara et al., 2004). As folhas foram infiltradas com uma solução de MS-Silwet contendo cinetina (30 µg/L) e as proteínas foram extraídas 3 h depois de infiltração. Foi mostrado que o inibidor de invertase expressado nestas plantas está localizado na parede celular (Weil et al., 1994), portanto foi usada fração de proteína insolúvel nas provas. A fração solúvel foi usada como um controle onde não deve ser observado efeito sobre valores adicionados de extratos

incubados independentemente. A disponibilidade de maiores quantidades de material neste caso possibilitou a concentração de proteínas através de uma coluna Centricon 10K, com um fator de concentração de 11,6 e 21,7 na fração solúvel e insolúvel das folhas tratadas, respectivamente. Extratos mistos de fração da parede celular de folhas selvagens e da fração da parede celular concentrada de folhas transgênicas infiltradas apresentaram 70% de atividade de invertase com respeito ao valor adicionado de reações independentes correspondentes (consideradas como 100%). Foi observada redução similar com uma fração da parede celular não concentrada de folhas transgênicas infiltradas, mas com uma proporção de 4:1 de volume da fração insolúvel transgênica com respeito à fração solúvel selvagem. Não foram obtidas diferenças com respeito ao valor adicionado quando frações solúveis de folhas transgênicas foram usadas em combinação com a fração da parede celular de folhas selvagens, de acordo com a localização do transgene na fração da parede celular. Até o momento, a concentração de sacarose na prova para atividade de invertase foi de 5 mM, bastante acima da Km de invertases para sacarose, de modo a medir a atividade de invertase máxima. Nós realizamos as provas na presença de uma concentração menor de sacarose, 1 mM, de modo a ver se o efeito do inibidor sobre a atividade de invertase é mais claramente detectado. A atividade de invertase de uma fração da parede celular de folhas selvagens combinada com uma fração da parede celular concentrada de folhas transgênicas foi 58% do valor adicionado, ao passo que não foram observadas diferenças para os valores adicionados para uma fração solúvel concentrada de folhas transgênicas. Quando foi usado um extrato transgênico de parede celular não concentrado, os valores na prova mista foram de 55 a 72% do valor adicionado. Extratos mistos com uma fração solúvel concentrada / não concentrada de folhas transgênicas, em combinação com fração da parede celular de folhas selvagens, não apresentaram diferença na atividade de invertase com respeito aos valores adicionados. Estes resultados sugerem que este método pode ser adequado para a determinação da inibição de invertase por inibidor de invertase. A atividade do inibidor de invertase será avaliada nas diferentes

linhagens transgênicas por uso de extratos mistos, deste modo possibilitando não somente a determinação da inibição da atividade de invertase mas também a localização da proteína para a parede celular ou fração solúvel, embora os resultados obtidos até o momento indiquem a presença de atividade inibitória na fração solúvel para ambos os inibidores de invertase usados nos transgênicos.

Exemplo 6: Aumentada resistência de raízes de *Arabidopsis thaliana* transgênica contra infecção por *Plasmodiophora brassicae*

Plantas de *A. thaliana* transgênica expressando

10 a) Promotor *pyk10:AtC/VIF2*; ou

b) *crypticT80: AtC/VIF2*

foram geradas de acordo com o procedimento experimental resumido no exemplo 1.

15 Resistência das raízes das duas cepas de *A. thaliana* foram testadas como se segue:

Plantas de quatorze dias de idade cultivadas sob condições de estufa ou sob ambiente controlado (21°C, 16 h de luz, 100 μmol fótons/s/m²) foram inoculadas rotineiramente injetando o solo em torno de cada planta com 2 ml de uma suspensão de esporos em repouso do patógeno com uma concentração padrão de 10⁶ esporos / ml de acordo com Fuchs e Sacristan (1996). Foram escolhidos outros momentos de inoculação para os experimentos respectivos e são dados na seção de resultados.

Os sintomas de doenças foram avaliados 28 dias depois da inoculação (dai) usando uma escala consistindo de cinco classes de acordo com Klewer et al. (2001): 0 (sem sintomas), 1 (deformações (*clubs*) muito pequenas, essencialmente sobre raízes laterais que não prejudicam a raiz principal), 2 (pequenas deformações cobrindo a raiz principal e poucas raízes laterais), 3 (deformações de tamanho médio a maiores, também incluindo a raiz principal, o crescimento da planta pode ser prejudicado), 4 (várias deformações em raiz lateral, principal ou roseta, finas raízes completamente destruídas, o crescimento da planta é afetado). O índice de doença (DI) foi calculado usando a escala de cinco graus de acordo com a fórmula: DI =

$(1 \cdot n_1 + 2 \cdot n_2 + 3 \cdot n_3 + 4 \cdot n_4) \cdot 100/4 \cdot N_t$, onde n_1 a n_4 é o número de plantas na classe indicada e N_t é o número total de plantas testadas.

Os resultados são representados nas Figs. 34 e 35. Conforme pode ser deduzido a partir da Fig. 34, as raízes de plantas transgênicas infectadas por *Plasmodiophora brassicae* apresentaram um aumento na resistência.

Em contraste, linhagens KO únicas não foram afetadas significativamente conforme representado na Fig. 35.

Exemplo 7: Infecção de raízes de tabaco (*Nicotiana tabacum*) pelo fungo mycorrhiza *Glomus intraradices*: Efeito sobre a micorrização

Arbuscular mycorrhiza (AM) representa uma associação de interdependência disseminada entre fungos transportados pelo solo do filo Glomeromycota e a maioria das plantas da terra.

Nós estudamos o impacto de uma reduzida disponibilidade de hexose sobre a micorrização de *N. tabacum* ou *M. truncatula*. Foi obtido reduzido teor de hexose nas raízes por expressão, específica para raiz, de inibidor de invertase de *A. thaliana*. Inibindo especificamente a atividade de invertase da raiz, pode ser documentada a necessidade de suprimento de hexose suficiente para crescimento de AM. Plantas de *N. tabacum* *pyk10::Invlnh* com reduzida atividade de invertase ácida nas raízes apresentaram uma micorrização diminuída. À medida que esta amostra proporciona outro exemplo de evidência de que a interação entre microorganismos e plantas pode ser afetada em uma maneira negativa. Com base nesta observação também a interação entre plantas e patógenos de plantas tais como *Plasmodiophora* pode ser afetada e portanto é proporcionada uma estratégia para a proteção de plantas com base na inibição da atividade de invertase.

Construções de plasmídes, transformação de planta estável e determinação de atividades de invertases de planta

O promotor *pyk10* foi amplificado por PCR usando DNA genômico e subclonado no vetor pTF2-6 (T. Fatima e T. Roitsch, não publicado) para gerar pMB1-18. O cDNA codificando AtC/VIF2 (at5g64620) foi amplificado por RT-PCR usando RNA total, inicialmente clonado no vetor pBlues-

cript KS+ para gerar pMCG2, e subseqüentemente subclonado do mesmo como fragmento Acc65I-KpnI no vetor binário pTF2-6 para gerar o plasmídeo pMCG4. Para gerar uma fusão transcricional entre o promotor *pyk10* e o cDNA codificando AtC/VIF2, um fragmento de promotor *pyk10* de 1467 bp foi subclonado como fragmento Acc65I de pMB1-18 no vetor binário pMCG4, linearizado por Acc65I, para pMCG6 gerado. O constructo *pyk10::InvlNh* foi transformado em tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. SR1) usando *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 e procedimentos de transformação de rotina (Horsch et al. 1985). Linhagens transgênicas expressando a fusão *pyk10::InvlNh* foram caracterizadas por PCR (M. Gonzalez e T. Roitsch, não publicado).

Os resultados deste tipo de experimentos são representados nas Fig. 36 a 38. Mais especificamente, a Fig. 36 mostra o resultado de uma análise de plantas de tabaco transgênicas com expressão, específica para raiz, de um inibidor de invertase. A e B, Atividade de invertase da parede celular (A) e vacuolar (B) em raízes de plantas SR1 selvagens e plantas NT *pyk10::InvlNh* de duas linhagens independentes (98-1-10 e 98-4-1) 3,5 e 5 semanas depois de inoculação com *G. intraradices*. C, Teor de glucose e frutose das raízes. D, Proporção dos teores de glucose e frutose para o teor de sacarose das raízes. E, Grau de micorrização. Para possibilitar a análise estatística, o grau de micorrização em percentagem da extensão da raiz foi determinado para cada sistema de raiz em 50 a 100 peças de raiz de cada 1 cm de extensão. As plantas foram em dois experimentos independentes inoculadas com *G. intraradices* ou 2,5 semanas depois da semeadura e colhidas 3,5 semanas depois ou inoculadas 4 semanas depois da semeadura e colhidas 5 semanas depois. Os dados são apresentados como valores médios + desvio padrão (em 3,5 semanas: n = 5; em 5 semanas: n = 3). Os dados das linhagens transgênicas foram pareados comparados com as selvagens pelo teste *t* de Student. *P<0,05, **P<0,01. F, Estruturas fúngicas coradas com tinta em uma planta selvagem e uma planta NT *pyk10::InvlNh* da linhagem 98-1-10, cada uma 5 semanas depois da inoculação. As barras representam 100 µm.

A Fig. 38 mostra o resultado de uma análise de biomassa de plantas NT *pyk10::Invlnh*. A proporção de raiz para broto do peso fresco de plantas SR1 selvagens não-micorrizais de 6 semanas de idade e plantas de duas linhagens NT *pyk10::Invlnh* independentes (98-1-10 e 98-4-1). São dados os valores médios + desvio padrão. (n ≥ 33).

A Fig. 38 mostra o resultado de determinar atividades de invertase em plantas não-micorrizais e micorrizais NT *pyk10::Invlnh*. A, Atividades de invertase ligada à parede celular em raízes. B, Atividades de invertase vacuolar invertase activities em raízes. C, Atividades de invertase citosólica invertase activities em raízes. D, Atividades de invertase apoplásica em folhas. Plantas SR1 selvagens e plantas das duas linhagens de NT *pyk10::Invlnh* 98-1-10 e 98-4-1 foram inoculadas com *G. intraradices* 4 semanas depois da semeadura e colhidas 3 e 5 semanas depois. Os dados são apresentados como valores médios + desvio padrão (n = 3). Os dados das plantas transgênicas não-micorrizais e micorrizais foram comparados com as plantas selvagens não-micorrizais e micorrizais, respectivamente, usando o teste *t* de Student. *P<0,05, **P<0,01.

Conforme confirmado e ilustrado, respectivamente, pelos resultados indicados nas Figs. 36 a 38, devido a um subsuprimento geral da raiz com carbono por carga de floema defeituosa resultou em reduzida micorrização, a análise de plantas com reduzida atividade de invertase e reduzido descarregamento de floema complementam este estudo. Este aspecto foi implementado expressando o gene de Arabidopsis *AtC/VIF2* codificando para um inibidor de invertases ácidas (Link et al., 2004) sob controle do promotor *pyk10* de Arabidopsis específico para raiz e para muda (Nitz et al., 2001) em plantas transgênicas de *N. tabacum* (NT *pyk10::Invlnh*). Foi visto que proteína *AtC/VIF2* recombinante afeta atividades de invertases apoplásica e vacuolar in vitro (Link et al, 2004). Plantas das duas linhagens NT *pyk10::Invlnh* independentes, 98-1-10 e 98-4-1, apresentaram reduzidas atividades de invertase apoplásica na raiz (Fig. 36 A). A atividade de invertase vacuolar foi inibida in vitro somente em uma linhagem nos estágios de desenvolvimento posteriores (Fig. 36 B). Os níveis de atividade de invertase

citosólica neutra não foram afetados; o mesmo foi verdade para invertases em folhas (Fig. 38). Plantas não-micorrizais mostraram uma característica similar de atividades de invertase (Fig. 38). De acordo com a reduzida atividade de invertase apoplásica, as raízes tiveram menores teores de glucose e frutose (A Fig. 36 C mostra a soma de ambas hexoses) e uma proporção reduzida de ambas hexoses para sacarose (Fig. 36 D). No entanto, em contraste com tabaco *rolC::ppa*, plantas com superexpressão específica para raiz de inibidor de invertase não foram alteradas em seu crescimento vegetativo e sua biomassa de raiz ou broto comparada com plantas selvagens, por meio da qual a Fig. 37 mostra a proporção de raiz para broto do peso fresco conforme determinado em princípio, conforme descrito na parte de exemplos aqui, neste requerimento de patente. Não obstante, correspondendo aos menores níveis de hexose nas raízes de plantas *pyk10::Invlnh* nós descobrimos um menor nível de micorrização com *G. intraradices* (Fig. 36 E). Além disso, raízes colonizadas de plantas NT *pyk10::Invlnh* apresentaram uma menor densidade de estruturas fúngicas comparadas com o tipo selvagem (Fig. 36 F) refletida por uma significativa redução no rRNA específico de fungo 5 semanas depois de inoculação (dados não mostrados). Isto indica que o suprimento de carbono na interação AM depende da atividade de invertases apoplásicas que liberam hexoses.

Referências:

Do início ao fim da presente especificação foram citadas as seguintes referências cuja descoberta é incorporada aqui, a este requerimento de patente, por meio de referência em sua totalidade.

25 Balibrea Lara M.E., González García M.-C., Fatima T., Ehness R., Lee T.K., Proles R., Tanner W. and Roitsch T. (2004). Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *Plant Cell* 16, 1276-1287.

30 Bret-Harte M. and Silk W.K. (1994). Nonvascular, symplasmic diffusion of sacarose cannot satisfy the carbon demands of growth in the primary root tip of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* 105, 19-33.

Eschrich W. (1980). Free space invertase, its possible role in p-

hloem unloading. Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd. 93, S363-378.

Farrar J.F. and Jones D.L. (2000). The control of carbon acquisition by roots. *New Phytol.* 147, 43-53.

5 Fuchs, H., M. D. Sacristan (1996): Identification of a gene in *Arabidopsis thaliana* controlling resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) and characterization of the resistance response. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9, 91-97.

Gatz C, Lenk I (1998) Promoters that respond to chemical inducers. *Trends in Plant Science* 3, 352-358.

10 Goetz M., Godt D.E., Guivarc'h A., Kahmann U., Chriqui D. and Roitsch T. (2001). Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6522-6527.

15 Greiner S., Krausgrill S. and Rausch T. (1998). Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor: Proof of function of the recombinant protein and expression analysis during plant development. *Plant Physiol.* 116, 733-742.

Greiner S., Rausch T., Sonnewald U. and Herbers K. (1999). Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers. *Nature Biotech.* 17, 708-711.

20 Heyer A.G., Raap M., Schroeer B., Marty B. and Willmitzer L. (2004). Cell wall invertase expression at the apical meristem alters floral, architectural, and reproductive traits in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 39, 161-169.

25 Klewer A., H. Luerßen, H. Graf, J. Siemens (2001): RFLP markers to characterise *Plasmodiophora brassicae* single-spore-isolates with different virulence patterns. *J. Phytopathol.* 149, 1-7.

Link M, Rausch T, Greiner S (2004) In *Arabidopsis thaliana*, the invertase inhibitors AtC/VIF1 and 2 exhibit distinct target enzyme specificities and expression profiles. *FEBS Lett* 27: 105-109.

30 Link M., Rausch T. and Greiner S. (2004). In *Arabidopsis thaliana*, the invertase inhibitors AtC/VIF1 and 2 exhibit distinct target enzyme specificities and expression profiles. *FEBS Lett.* 573, 105-109.

Miller E.M. and Chourey P.S. (1992). The maize invertase-deficient *miniature-1* seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development. *Plant Cell* 2, 1107-1119.

5 Nitz I, Berkefeld H, Puzio PS, Grundler FM (2001) Pyk10, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 161: 337-346.

Rausch T. and Greiner S. (2004). Plant protein inhibitors of invertases. *Biochim. Biophys. Acta* 1696, 253-261.

10 Roitsch T., Bittner M. and Godt D.E. (1995). Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analogue and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiol.* 108, 285-294.

Roitsch T. and González M.-C. (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci.* 9, 606-613.

15 Siemens, J., Nagel, M., Ludwig-Müller, J., and Sacristán, M. D. 2002. The interaction of *Plasmodiophora brassicae* and *Arabidopsis thaliana*: Parameters for disease quantification and screening of mutant lines. *J. Phytopath.* 150:592-605.

20 Sturm A., Sebkova V., Lorenz K., Hardegger M., Lienhard S. and Unger C. (1995). Development- and organ-specific expression of the genes for saccharose synthase and three isoenzymes of acid β -fructosidase in carrot. *Planta* 195, 601-610.

25 Tang G.-Q., Lüscher M. and Sturm A. (1999). Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and saccharose partitioning. *Plant Cell* 11, 177-189.

Tymowska-Lalanne Z. and Kreis M. (1998). Expression of the *Arabidopsis thaliana* invertase gene family. *Planta* 207, 259-265.

30 Von Schweinichen and Büttner M. (2005). Expression of a plant cell wall invertase in roots of *Arabidopsis* leads to early flowering and an increase in whole plant biomass. *Plant Biol.* 7, 469-475.

Weber H., Borisjuk L., Heim U., Sauer N. and Wobus U. (1997). A role for sugar transporters during seed development: molecular characteri-

zation of a hexose and a sacarose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* 9, 895-908.

Weil M., Krausgrill S., Schuster A. and Rausch T. (1994). A 17-kDa *Nicotiana tabacum* cell-wall peptide acts as in-vitro inhibitor of the cell-wall isoform of acid invertase. *Planta* 193, 438-445.

Weschke W., Panitz R., Gubatz S., Wang Q., Radchuk R., Weber H. and Wobus U. (2003). The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues in barley caryopses during early development. *Plant J.* 33, 395-411.

Wobus U. and Weber H. (1999). Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol. Chem.* 380, 937-944.

As características das presente invenção reveladas na especificação, nas reivindicações e/ou nos desenhos podem ser tanto separadamente quanto em qualquer combinação das mesmas ser material para realizar a invenção em várias formas da mesma.

Listagem de Seqüência

<110> Julius-Maximilians-Universität würzburg
 <120> Métodos para aumentar a proporção de broto para raiz, a produção de sementes e a resistência a doenças

<130> U 10022 PCT
 <150> EP 06004640.6
 <151> 2006-03-07
 <160> 46
 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 407
 <212> DNA
 <213> Brassica napus
 <400> 1

gatccatcga ctgcctggtt caacaaaaa gatgggtact ggagaatgct tgtgggctca 60
 aagaacaagc gtagaggaat tgcttatatg tacaaaagtc gtgacttcaa gaaatgggctc 120
 aaaactagac gtccccgtaca cactagaaaa gcaaccggta tgtgggaatg tccccgacttt 180

| | | |
|----|--|-----|
| | ttccccggttt ccattggcaa gaaaaccggt ttagacacca gctatgacgg tccaaacacc | 240 |
| | aagcatgtgt tgaaggtag cttggacctg accaggtacg agtactacac tcttggaacg | 300 |
| | tatgatacta agaaggatcg ttacaagcct gatggtacca gtcctgatgg ttgggatggt | 360 |
| | ttgagactag attatggtaa cttctatgcg tcgaagtcct tctttga | 407 |
| 5 | <210> 2 | |
| | <211> 410 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Brassica napus | |
| | <400> 2 | |
| 10 | gacccccaaa cggcctggct tggacgtgac ggagaatggc gagtaatcgt cggaagctcg | 60 |
| | acggacgacg gacgaggatt agcgattctt tacaaaagca gagatttctt caactggacg | 120 |
| | caatcaacga agcctttaca ttacaagac ttaaccggaa tgtgggaatg tcctgatttt | 180 |
| | ttccccggttt cgataaccgg atcggacggt gtagaagcgt cgtcggttgg tgagaatggg | 240 |
| | attaagcatg tgcttaaagt gagtttgatt gagacattgc atgtttaata cacgattggg | 300 |
| 15 | agttatgatc gtgagaaaga tgtttacgta ccggatcttg ggtttgtgca aaacgaatca | 360 |
| | actccgaggt tagattacgg gaaatattac gcgtccaagt cgttcttcga | 410 |
| | <210> 3 | |
| | <211> 407 | |
| | <212> DNA | |
| 20 | <213> Brassica napus | |
| | <400> 3 | |
| | gatccgacct ctgcttggtt caacaaaaaa gatgggtact ggagaatgct tgtgggctca | 60 |
| | aagaacaagc gtgaggaat tgcttatatg tacaaaagtc gtgacttcaa gaaatgggtc | 120 |
| | aaaactagac gtcccgtaca cactagaaaa gcaaccgta tgtgggaatg tcccgacttt | 180 |
| 25 | ttccccggttt ccatcggcaa gaaaaccggt ttagacacca gctatgacgg tccaaacacc | 240 |
| | aagcatgtgt tgaaggtag cttggacctg accaggtacg agtactacac tcttggaacg | 300 |
| | tatgatacta agaaggatcg ttacaagcct gatggtacca ctcctgatgg ttgggatggt | 360 |
| | ttgagactag attatggtaa cttctatgca tcgaaaactt tctacga | 407 |
| | <210> 4 | |
| 30 | <211> 410 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Brassica napus | |

| | | | | |
|----|-------|----------------|--|-----|
| | <400> | 4 | | |
| | | | gacccgacga ctgcttgga gacatcagcc ggaaaatggc ggatcactat tggttccaag | 60 |
| | | | atcaacagaa ccgggatctc actcgtgtac gacacgactg acttcaagac ttacgagaaa | 120 |
| | | | ctcgacacat tgttgacaa agttccaaac accgggatgt gggagtgtgc tgacttttat | 180 |
| 5 | | | cctgtgtcta agaccttggg taaggggctc gactcatcgg tcaatggacc agatgtgaag | 240 |
| | | | cacatcgtga aggctagtat ggacgacacc agaatcgacc attatgccat aggaacatat | 300 |
| | | | ttcgattcga acgggacgtg gatcccggat gatcctacta ttgatgttg gattagtact | 360 |
| | | | agtttaagat atgattacgg aaagtctat gcgtcgaaga ctttttcga | 410 |
| | <210> | 5 | | |
| 10 | <211> | 407 | | |
| | <212> | DNA | | |
| | <213> | Brassica napus | | |
| | <400> | 5 | | |
| | | | gacccacga ctgcttggtt caacaaaaa gatgggact ggagaatgct tgtgggctca | 60 |
| 15 | | | aagaacaagc gtagaggaat tgcttatatg tacaaaagtc gtgacttcaa gaaatgggctc | 120 |
| | | | aaaactagac gtcccgtaca cactagaaaa gcaaccgta tgtgggaatg tcccgacttt | 180 |
| | | | ttcccggttt ccatcggcaa gaaaaccggt ttagacacca gctatgacgg tccaaacacc | 240 |
| | | | aagcatgtgt tgaaggttag cttggacctg accaggtacg agtactacac tcttgaacg | 300 |
| | | | tatgatacta agaaggatcg ttacaagcct gatggtacca ctctgatgg ttgggatggt | 360 |
| 20 | | | ttgagactag attatggtaa cttctatgcg tcgaagacct ttttcga | 407 |
| | <210> | 6 | | |
| | <211> | 407 | | |
| | <212> | DNA | | |
| | <213> | Brassica napus | | |
| 25 | <400> | 6 | | |
| | | | gacccgacca cggcttggtt caacaaaaa gatgggact ggagaatgct tgtgggctca | 60 |
| | | | aagaacaagc gtagaggaat tgcttatatg tacaaaagtc gtgacttcaa gaaatgggctc | 120 |
| | | | aaaactagac gtcccgtaca cactagaaaa gcaaccgta tgtgggaatg tcccgacttt | 180 |
| | | | ttcccggttt ccatcggcaa gaaaaccggt ttagacacca gctatgacgg tccaaacacc | 240 |
| 30 | | | aagcatgtgt tgaaggttag cttggacctg accaggtacg agtactacac tcttgaacg | 300 |
| | | | tatgatacta agagggatcg ttacaagcct gatggtacca ctctgatgg ttgggatggt | 360 |
| | | | ttgagactag attatggtaa cttctatgcc tcgaagactt ttttcga | 407 |

<210> 7
 <211> 410
 <212> DNA
 <213> Brassica napus
 5 <400> 7
 gatccaacaa cggcttggtt caacaaggaa gatgggtatt ggagaatgct tgttggtca 60
 aagagaaaga acagaggaat tgcttatatg tacaagagcc gtgacttcaa aaaatgggtc 120
 aaaggcaaac atcctaacca ctcaagaaag aaaaccggta tgtgggaatg tcccgatctc 180
 ttcccgggat tcgtaaccga caagaaaaac ggtttggact tcagctacga cggccaac 240
 10 gccaaagcatg tgtgaaggt tagtttgac ttgaccagat acgagtacta cactcttga 300
 acgtatgaca ccaagaagga tcgttacagg ccagacggtt acactcctga cggttgggat 360
 ggtttgagat ttgattatgg taactactat gcgtcaaat cgttctcga 410
 <210> 8
 <211> 412
 15 <212> DNA
 <213> Brassica napus
 <400> 8
 gacccatcca ctgcttggtt aggccaagac aagaaatgga gagtgattat cggaagcaag 60
 attcaccgtc gtggactagc catcacttac acgagtaaag actttctaaa atggggaaaa 120
 20 tctccagagc cgtcgatta cgacacgga agtggaatgt gggaaatgctc tgatttttc 180
 ccggtcacga ggtttggttc taacggcgtg gaaacgtctt cgtttgtga acctaagag 240
 attttgaagc acgtgttgaa aataagtttg gacgacacga aacatgatta taacacgatt 300
 ggtacgtacg atcgggttaa agataaattc gtaccggaca atggtttcaa gatggacggt 360
 acggctccga gatacgatac ggaaagtatt acgcgtccaa aacattctat ga 412
 25 <210> 9
 <211> 410
 <212> DNA
 <213> Brassica napus
 <400> 9
 30 gatccgtcca ctgcctggtt caacaaaaaa gatgggtatc ggagaatgct tgttggtca 60
 aagagaaaga acagaggaat tgcttatatg tacaagagcc gtgacttcag aaaatgggtc 120
 aaaagcaaac gtcctatcca ctcaagaaag aaaaccggta tgtgggaatg tcccgatctc 180

| | | |
|----|---|-----|
| | ttcccggat ccgtaaccga caagaaaaac ggtttgact tcagctacga cggtcctaac | 240 |
| | gccaagcatg tgttgaagg tagtttgac ttgaccagat acgagtacta cactcttga | 300 |
| | acgtatgaca ccaagaagga tcgttacagg ccagacgggt acactcctga cggttgggat | 360 |
| | ggtttgagat ttgattatgg taactactat gcgtcgaagt cattttacga | 410 |
| 5 | <210> 10 | |
| | <211> 410 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Brassica napus | |
| | <400> 10 | |
| 10 | gacccaacca ccgcttggt tggacgtgac ggagaatggc gagtaatcgt cggaagctcg | 60 |
| | acggacgacg gacgaggatt agcgattctt tacaagca gagatttctt caactggacg | 120 |
| | caatcaatga agcctttaca ttacgaagac ttaaccgaa tgtgggaacg tcctgatttt | 180 |
| | ttcccggttt cgataaccgg atcggacggt gtagaaacgt cgtcggttgg tgagaatggg | 240 |
| | attaagcgtg tgcttaaagt gagtttgatt gagacattgc atgattatta cacgattggg | 300 |
| 15 | agttatgatc gtgagaaaga tgtttacgta ccgatcttg ggtttgcgca aaacgaatca | 360 |
| | gctccgaggt tagattacgg gaaatattac gcgtccaagt ctttctacga | 410 |
| | <210> 11 | |
| | <211> 413 | |
| | <212> DNA | |
| 20 | <213> Brassica napus | |
| | <400> 11 | |
| | gatcccacca ctgcctggct aggccaaggc aagaaatgga gagtgatcat cggaagcaag | 60 |
| | attcaccgtc gtggactagc cttacttac acgagtaaag acttttctaaa atgggaaaaa | 120 |
| | tctccagagc cgttgatta cgacgacgga agtggaatgt gggaatgtcc tgattttttc | 180 |
| 25 | ccagtcacga ggtttggttc taacggcgtg gaaacgtctt cgtttggtga acctaatgag | 240 |
| | atgttgaagc acgtgttgaa gataagtttg gacgacacga aacatgacta ttacacgatt | 300 |
| | ggtacgaacg atcgggtcaa agataaattc gtaccggaca atggtttcaa gatggacggt | 360 |
| | acggttccga gatacatta tggaaagtat tacgcgtcaa aaacgttctt cga | 413 |
| | <210> 12 | |
| 30 | <211> 407 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Brassica napus | |

<400> 12
 gacccgtcga cggcgtggta ctccaaagac gggcattgga gaaccgtggt agggtcaaaa 60
 agaaagcgtg gaggaattgc ttacatctac agaagccgag atttcaagca ttgggtcaaa 120
 gctaagcacc cggttcactc taaacagtca accggtatgt gggaatgtcc tgatttcttc 180
 5 ccggtttcct taaccgattt ccgaaacggt ttggacttgg attacgtcgg tccaaacacc 240
 aagcatgtgt tgaaggttag cttggacatt acccggtag agtattacac gcttggtaaa 300
 tacgatctta agaaggaccg gtacataccg gacggtaata ctcccgatgg ttgggagggt 360
 ttgagattcg attacggtaa tttctacgcg tccaagtcac ttttcga 407
 <210> 13
 10 <211> 408
 <212> DNA
 <213> Brassica napus
 <400> 13
 gatccgtcca ctgctggct tggacgtgac ggagaatggc gagtaatcgt cggaagctcg 60
 15 acggagcgtc gacgaggatt agcgattctt taaaaagca gagatttctt caactggacg 120
 caatcaacga agcctttaca tacgaagact taaccggaat gtgggaatgt cctgattttt 180
 tcccggtttc gataaccgga tcggacggtg tagaaacgtc gtcggttggg gggaatggga 240
 ttaagcatgt gctaaagtga gtttgattgg gacattgcat gattattaca cgattgggag 300
 ttatgatcgt gagaaagatg gttacgtacc ggatcttggg tttgtgcaa acgaatcagc 360
 20 tccgaggtta gattacggga aatattacgc gtccaaatca ttctacga 408
 <210> 14
 <211> 754
 <212> DNA
 <213> Brassica napus
 25 <400> 14
 tccttcacct gttctaccag tacaatcca aaggtgctgt ttggggtaac attgtgtggg 60
 ctcattcagt ttctaaggac ttgatcaatt gggaagctct tgaaccggtc atttaccctt 120
 ccaaaggtt tgatatcaat ggtacatggt cgggttcagc caccaacgta ccgggaaaag 180
 gaccggttat cctctacact ggtatcaccg agaaccatac tcagatccaa aattatgcca 240
 30 ttcccaaga cctttccgac ccatacctca agaatggat caagcccgac gacaacccta 300
 tcgtaagacc cgaccatggc gagaatggat ccgctttccg tgaccggaca actgcttggg 360
 tcaacaaaaa agatggggcag tggagaatgc ttgtgggctc aaagaacaag cgtagaggaa 420

ttgcttatat gtacaaaagt cgtgacttca agaaatgggt caaaactaga cgtcccgtac 480
 aactagaaa agcaaccggg atgtgggaat gtcccgactt tttcccgggt tccatcggca 540
 agaaaaccgg tttagacacc agctatgacg gtccaaacac caagcatgtg ttgaaggtta 600
 gcttggacct gaccaggtac gagtactaca ctcttggaac gtatgatact aagaaggatc 660
 5 gttacaagcc tgatggtacc actcctgatg gttgggatgg tttgagacta gattatggta 720
 acttctacgc atcaaaaact ttctacgaaa ggaa 754
 <210> 15
 <211> 759
 <212> DNA
 10 <213> Brassica napus
 <400> 15
 tccttcactt gttttatcag tacaatccat acggcgccgt ttgggatgta agaatcgtgt 60
 ggggtcactc cacgtcactt gatctagtta actggacccc acagcctcca gcattcagtc 120
 catctcagcc gtcagacatc aacggttggt ggtcaggctc cgtcacgatt ctaccaaacg 180
 15 gcacaccggg gatcctctac accggcattg accaaaacaa aagtcaagtc caaacgctcg 240
 ccgttccgct taacatctcc gatccatc tccgcgaatg gtcaaagtcg ccggcaaadc 300
 ctctgatggc tcctaacgcc gtcaacggaa tcaaccccga ccggttccga gacccgacca 360
 ccgctgggct aggacacgac ggagaatgga gagtcatcgt cggaagctcg acggacgatc 420
 gtcgaggatt agcggttctt tacaagagca gagatttctt caactggacg caagcgacga 480
 20 agcctcttca ccacgaagac ttaaccggaa tgtgggagtg tcctgatttt ttcccggttt 540
 cgataaccgg aacggacggg ctcgagacgt cgtcgtttgg tgagggtgaaa cacgtgctga 600
 aagtgagttt gatcagacg ttgcatgatt attacacggg tgggagttac gaccgtgaga 660
 aggatgttta cgtaccggat catgggtttg tgcaagatgg ttcggctccg aggctggact 720
 acgggaagtt ttacgcaacc aaaaccttct acgaaagga 759
 25 <210> 16
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> Brassica napus
 <400> 16
 30 tccttcactt gttttaccag tataatccat acggcgccgt ttgggatgta agaatcgtgt 60
 ggggtcactc cacgtcactt gatctagtta actggacccc acagcctcca gcattcagtc 120
 catctcagcc gtcagacatc aacggttggt ggtcaggctc cgtcacgatt ctaccaaacg 180

| | | |
|----|--|-----|
| | gcacaccggt gatcctctac accggcattg accaaaacaa aagtcaagtc caaaacgtcg | 240 |
| | ccgttccgct taacatctcc gatccatata tccgcgaatg gtcaaagtcg ccggcaaatac | 300 |
| | ctctgatggc tcctaacgcc gtcaacggaa tcaaccccga ccggttccga gacccgacca | 360 |
| | ccgcgtggct aggacacgac ggagaatgga gagtcatcgt cggaagctcg acggacgatac | 420 |
| 5 | gtcgaggatt agcggttctt tacaagagca gagatttctt caactggacg caagcgacga | 480 |
| | agcctcttca ccacgaagac ttaaccggaa tgtgggagtg tcctgatttt ttcccggttt | 540 |
| | cgataaccgg aacggacggt ctcgagacgt cgtcgtttgg tgaggtgaaa cacgtgctga | 600 |
| | aagtgagttt gatcgagacg ttgcatgatt attacacggt tgggagttac gaccgtgaga | 660 |
| | aggatgttta cgtaccggat catgggtttg tgcaagatgg ttcggctccg aggctggact | 720 |
| 10 | acgggaagtt ttacgcatcc aagacctttt atgaaagga | 759 |
| | <210> 17 | |
| | <211> 759 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Brassica napus | |
| 15 | <400> 17 | |
| | tccttcactt cttttatcag tataatccat acggcgcgct ttgggatgta agaatcgtgt | 60 |
| | ggggtcactc cacgtcactt gatctagtta actggacccc acagcctcca gcattcagtc | 120 |
| | catctcagcc gtcagacatc aacggttggt ggtcaggctc cgtcacgatt ctaccaaacg | 180 |
| | gcacaccggt gatcctctac accggcattg accaaaacaa aagtcaagtc caaaacgtcg | 240 |
| 20 | ccgttccgct caacatctcc gatccatata tccgcgaatg gtcaaagtcg ccggcaaatac | 300 |
| | ctctgatggc tcctaacgcc gtcaacggaa tcaaccccga ccggttccga gacccgacca | 360 |
| | ccgcgtggct aggacacgac ggagaatgga gagtcatcgt cggaagctcg acggacgatac | 420 |
| | gtcgaggatt agcggttctt tacaagagca gagatttctt caactggacg caagcgacga | 480 |
| | agcctcttca ccacgaagac ttaaccggaa tgtgggagtg tcctgatttt ttcccggttt | 540 |
| 25 | cgataaccgg aacggacggt ctcgagacgt cgtcgtttgg tgaggtgaaa cacgtgctga | 600 |
| | aagtgagttt gatcgagacg ttgcatgatt attacacggt tgggagttac gaccgtgaga | 660 |
| | aggatgttta cgtaccggat catgggtttg tgcaagatgg ttcggctccg aggctggact | 720 |
| | acgggaagtt ttacgcatcc aaaaccttct acgaaagga | 759 |
| | <210> 18 | |
| 30 | <211> 753 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Brassica napus | |

| | | | |
|----|---|-----|--|
| | <400> 18 | | |
| | tccttcactt cttttaccag tataaccctt acgatgcaca atccggaaac atagtctggg | 60 | |
| | gacattctac atcaactgat cttatcaact ggacacctca gccgccggca ctactccgat | 120 | |
| | cagagcctta tgattttaaa ggctgttttt caggttctac acaattctc tccggcggaa | 180 | |
| 5 | aaccggcaat tctctatacc ggagtagact tctccgatat ccaagttcaa aatctagccg | 240 | |
| | tgcccaaaaa tttattggac cttacctta tagaatgggt aaaatcacct tataatccac | 300 | |
| | taataacacc taattcagtg aataaaaattg atgggtcaaaa tttcagagac ccgactactg | 360 | |
| | cttgggtaaa tcctacagat ggtaattgga gaatggtagt tggaataaaa aaaataaca | 420 | |
| | caggaattgg tttattgtac aaaagcaaga attttattga ttggattcaa actgaacaac | 480 | |
| 10 | ctttgcattt tttaaacaat tctggaatgt gggaatgtcc tgattttttc ccagtttcaa | 540 | |
| | caattagtca aattggttta gacacttca ttatgggtcc aatgtaaaa catgtattca | 600 | |
| | aagtaagtgt agcaaattct gattactata caattggaat atataatcca aataaggata | 660 | |
| | tctttgtccc ggataatgaa tccttgata ttggattagg atttagatat gattatggaa | 720 | |
| | agtattacgc atcaaaaacc ttctttgaaa gga | 753 | |
| 15 | <210> 19 | | |
| | <211> 702 | | |
| | <212> DNA | | |
| | <213> Brassica napus | | |
| | <400> 19 | | |
| 20 | tccttcacct gttttatcag tataaccctt acgatgcaca atccggaaac atagtctggg | 60 | |
| | gacattctac atcaactgat cttatcaact ggacacctca gccgccggca ctactccgat | 120 | |
| | cagagccgta tgattttaaa ggctgttttt caggttctac acaattctc tccggcggaa | 180 | |
| | aaccggcaat tctctatacc ggagtagact tctccgatat ccaagttcaa aatctagccg | 240 | |
| | tgcccaaaaa tttattggac cttacctta tagaatgggt aaaatcacct tataatccac | 300 | |
| 25 | taataacacc taattcagtg aataaaaattg atgggtcaaaa tttcagagac ccaactactg | 360 | |
| | cttgggtaaa tcctacagat ggtaattgga gaatggtagt tggaataaaa aaaataaca | 420 | |
| | caggaattgg tttattgtac aaaagcaaga attttattga ttggattcaa actgaacaac | 480 | |
| | ctttgcattt tttaaacaat tctggaatgt gggaatgtcc tgattttttc ccagtttcaa | 540 | |
| | caattagtca aattggttta gacacttcaa ttatgggtcc aatgtaaaa catgtattca | 600 | |
| 30 | aagtaagtgt agcaaattct gattactata caattggaat atataatcca aataaggata | 660 | |
| | ttttgtccc ggataatgaa tccttgata ttggattagg at | 702 | |
| | <210> 20 | | |

<211> 752

<212> DNA

<213> Brassica napus

<400> 20

5 tccttcactt gttttatcag tacaaccctt acgatgcaca atccggaac atagtctggg 60
gacattctac atcaactgat cttatcaact ggacacctca gccgccggca ctactccgat 120
cagagcctta tgattttaaa ggctgttttt caggttctac aacaattctc tccggcggaa 180
aaccggcaat tctctatacc ggagtagact tctccgatat ccaagttcaa aatctagccg 240
tgcccaaaaa tttattggac cttacctta tagaatgggt aaaatcacct tataatccac 300
10 taataacacc taattcagtg aataaaattg atgggtcaaaa tttcagagac ccaactactg 360
cttgggtaaa tcctacagat ggtaattgga gaatggtagt tggaaataaa aaaaataaca 420
caggaattgg tttattgtac aaaagcaaga attttattga ttggattcaa actgaacaac 480
ctttgcattt tttaaacaat tctggaatgt gggaatgtcc tgattttttc ccagtttcaa 540
caattagtca aattggttta gacacttcaa ttatgggtcc aatgtaaaa catgtattca 600
15 aagtaagtgt agcaaattct gattactata caattggaat atataatcca aataaggata 660
tttttgtccc ggataatgaa tccttgata ttggattagg atttagatat gattatggaa 720
agtattacgc taccaaacct tctacgaaag ga 752

<210> 21

<211> 752

20 <212> DNA

<213> Brassica napus

<400> 21

tccttcactt tttctatcag tacaatcctt acgatgcaca atccggaac atagtctggg 60
gacattctac atcaactgat cttatcaact ggacacctca gccgccgcac tactccgatc 120
25 agagccttat gattttaaag gctgtttttc aggttctaca acaattctct ccggcggaaa 180
accggcaatt ctctataccg gagtagactt ctccgatatc caagttcaaa atctagccgt 240
gcccaaaaat ttattggacc cttaccttat agaatgggta aatcacctt ataatccact 300
aataacacct aattcagtga ataaaattga tgggtcaaaa ttcagagacc caactactgc 360
ttgggtaaat cctacagatg gtaattggag aatggtagtt ggaaataaaa aaaataacac 420
30 aggaattggg ttattgtaca aaagcaagaa ttttattgat ttgattcaaa ctgaacaacc 480
tttgcatttt ttaacaatt ctggaatgtg ggaatgtcct gattttttcc cagtttcaac 540
aattagtcaa attggcttag acacttcaat tatgggtcca aatgtaaac atgtattcaa 600

| | | |
|----|---|-----|
| | agtaagtgta gcaaattctg attactatac aattggaata tataatccaa ataaggatat | 660 |
| | ttttgtcccg gataatgaat ccttgatgat tggattagga tttagatatg attatggaaa | 720 |
| | gtattacgca tccaaaacct tttacgaaag ga | 752 |
| | <210> 22 | |
| 5 | <211> 752 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> Brassica napus | |
| | <400> 22 | |
| | tccttcactt gttttatcag tacaaccctt acgatgcaca atccggaac atagtctggg | 60 |
| 10 | gacattctac atcaactgat cttatcaact ggacacctca gccgccggca ctactccgat | 120 |
| | cagagcctta tgattttaaa ggctgttttt caggttctac aacaattctc tccggcggaa | 180 |
| | aaccggcaat tctctatacc ggagtagact tctccgatat ccaagttcaa aatctagccg | 240 |
| | tgcccaaaaa tttattggac cttacctta tagaatgggt aaaatcacct tataatccac | 300 |
| | taataacacc taattcagtg aataaaattg atggtcaaaa tttcagagac ccaactactg | 360 |
| 15 | cttgggtaaa tcctacagat ggtaattgga gaatggtagt tggaaataaa aaaaataaca | 420 |
| | caggaattgg tttattgtac aaaagcaaga attttattga ttggattcaa actgaacaac | 480 |
| | ctttgcattt tttaaacaat tctggaatgt gggaatgtcc tgattttttc ccagtttcaa | 540 |
| | caattagtca aattggttta gacacttcaa ttatgggtcc aaatgtaaaa catgtattca | 600 |
| | aagtaagtgt agcaaattct gattactata caattggaat atataatcca aataaggata | 660 |
| 20 | ttttgtccc ggataatgaa tccttgata ttggattagg atttagatat gattatggaa | 720 |
| | agtattacgc taccaaacct tctacgaaag ga | 752 |
| | <210> 23 | |
| | <211> 410 | |
| | <212> DNA | |
| 25 | <213> Brassica napus | |
| | <400> 23 | |
| | gatccctcga ctgcatggaa gacatcagcc ggaaaatggc ggatcactat tggttccaaa | 60 |
| | atcaacagaa ccgggatctc actcgtgtac gacacgactg acttcaagac ttacgagaaa | 120 |
| | ctcgacacat tgttgcacaa agttccaaac accgggatgt gggagtgtgt tgacttttat | 180 |
| 30 | ccagtgtcta agaccttggg taaggggctc gacacatcgg tcaatggacc agatgtgaag | 240 |
| | cacgtcgtga aggctagtat ggacgacacc agaatcgacc attatgcat aggaacatat | 300 |
| | ttcgattcga acgggacgtg gatcccgat gatcctacta ttgatgttg gattagtact | 360 |

agttaaagat atgattgCGG aaagttttat gcctccaagt ccttttacga 410
 <210> 24
 <211> 444
 <212> DNA
 5 <213> Brassica napus
 <400> 24
 gacccatcga cggcctggaa gacatcagat ggaaaatggc ggatcacaat cggttccaag 60
 atcaacaaaa cgggatctc actagtgtac gacacaatcg acttcaagac ttacgagaaa 120
 cacgacacat tgttgacaa ggttccaaac acggggatgt gggagtgtgt tgacttctat 180
 10 ccagtgtcta agaccgcat caatgggctc gacacatcag tcaacggacc aaatgtgaag 240
 cacatcgtga aggctagcat ggacgacacc aggtttgatc attatgccgt ggggacgtac 300
 tttgattcga acggaacatg gatcccggat gatcctacta ttgatgttgg gatgagtgtc 360
 agtttgagat atgattacgg aaagttctat gcctcaaagt cattctatga atggtaacta 420
 ctatgcgtcg aagtcatttt acga 444
 15 <210> 25
 <211> 782
 <212> DNA
 <213> Brassica napus
 <400> 25
 20 tccttcactt gttttacaat ataatcctt agctccagag ttcagtagaa gaatcatatg 60
 gggccactct gtttcacaag acatgggtcaa ctggatccaa ctcccgccag cactttctcc 120
 ctctgagtcc tacgacatca acagctgctg gtcaggatcc gctacgatcc tccccgatgg 180
 caaacctgtg atcttgata cgggaatcga taaccaagag agacgggaag acagacggca 240
 agtcacagtt cttgccgtac ctaaagatgc ttccgaccct ttgcttcgtg agtggatgaa 300
 25 gccaaagcaa aacctgtca tggatccatc agaggacatc cttcactact gtttccgtga 360
 ccctaccact gcatggcaag gtcaagatgg taaatggaga gtttctatag gagctaagga 420
 gagagatact ctaagaggag tagctctttt gtaccatagt actgatgatt gtgagcaatg 480
 gactaggat caagaacctt tacttgtagc acaagccaac gaaatgttgg agtgcgttga 540
 ctttttccc gtttaagctca tgggtaaaga aggtgtagat acttcggtga acaatgctag 600
 30 tgtgaggcat gtgttgaaag ttagttttga ggaagaactt ggaggcaaag attgttatgt 660
 tattggctca tattgttccg agactgatag atttgtccc gactcagagc tacttacac 720
 acgtgctgat ctgagatatg atgatggatg gttttacgct accaaaacct tctatgaaag 780

| | | |
|----|---|-----|
| | ga | 782 |
| | <210> 26 | |
| | <211> 952 | |
| | <212> DNA | |
| 5 | <213> Brassica napus | |
| | <400> 26 | |
| | tccttcactt tttctatcaa tataacccaa atgcagccgt gtggggtgac attgtttggg | 60 |
| | gtcacgcagt gtctaaagat cttatccatt ggcttcacct cccgtttgca atggttcctg | 120 |
| | accaatggta cgacgctaac ggtgtttggga ccggttcggc tactttcctc gatgatggtt | 180 |
| 10 | ctattgtcat gctctacact ggatccaccg acaaattcgt acaagtatta ctttttaaaa | 240 |
| | ccattttctt gttaaataag tttttgattc ataattcttt tgatatgata tcaataactc | 300 |
| | ttttgatata ctggtgacag atttatataa aaccttaatt aatcctttaa aaatcatttc | 360 |
| | aaaataagat ttatcggacc aattagcgat aataatatta gctattatta tgtttttagg | 420 |
| | ttcaaaacct tgccctatcc tgaggacccc aatgatccac ttttgttgaa atggaccaag | 480 |
| 15 | ttctctggca acccggttct cgaaccgcct ccaggtatcg gtgataagga cttccgtgac | 540 |
| | ccaacaactg cgtggaagac atcagacgga aaatggcgga tcaactatcgg ccccaaaatc | 600 |
| | aatagaaccg gaatatccct tgtttatgac accgtcgatt tcaagaccta cgagaaacac | 660 |
| | gacatcttgt tgcaccaagt cccaaacaca ggaatgtggg agtgcgttga cttttatccg | 720 |
| | gtgtcaaaga ctaagcacca cggctctgac acttcagtta atggaccgga tgtttagcat | 780 |
| 20 | atagtgaaag ctagcatgga cgatacaaga attgaccatt atgccattgg gacgtactat | 840 |
| | gattctaattg gaacatgggt cccggataat ctttcaattg atgttgggat tagtaccggt | 900 |
| | ttgagatacg attacggtaa attttacgca acaaaaactt tctacgaaag ga | 952 |
| | <210> 27 | |
| | <211> 719 | |
| 25 | <212> DNA | |
| | <213> Brassica napus | |
| | <400> 27 | |
| | tccttcactt attctatcaa tataatccaa atgcagccgt gtggggtgac attgtttggg | 60 |
| | gtcacgctgt atcaaaggat cttatccact ggctttacct cccatttgcc atggttcctg | 120 |
| 30 | accaatggta cgatgctaac ggcgtttggga ccggttcagc tactttcctt gatgatggtt | 180 |
| | ctattgtcat gctctacact ggttccaccg acaaattcgt acaggtaatg attttttaaaa | 240 |
| | tccattttatt gcttcattaa tcacttttagt aatgcttgtg acagtataaa acgtgaataa | 300 |

| | | | | | | | |
|----|------------|----------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| | ttgtttcata | attaatattg | attccaattc | ttgtgtaat | gttgttat | actacgctt | 360 |
| | taggttcaaa | accttgcc | tcctgaagac | ccaaaagatc | cacttttg | gaaatggacc | 420 |
| | aagttctccg | gcaacccggt | tcttgtagca | cctccaggta | tcggtgctaa | ggacttccgt | 480 |
| | gaccaacaa | ctgcatggaa | gacttcagac | gggaaatggc | ggatcactat | tggctccaaa | 540 |
| 5 | atcaacagaa | ccggaatatc | tcttatttac | gatacaacag | atttcaagac | ctacgagaaa | 600 |
| | catgagacct | tgttgacca | agtcccaaac | actggagtg | gagtgtgtg | acttttatcc | 660 |
| | agtgtccaag | actaaagaca | agggtcttga | cacttcggtc | aatggaccgg | atgtaagc | 719 |
| | <210> | 28 | | | | | |
| | <211> | 945 | | | | | |
| 10 | <212> | DNA | | | | | |
| | <213> | Brassica napus | | | | | |
| | <400> | 28 | | | | | |
| | tccttcactt | gttttaccag | tacaatccaa | atggagccgt | gtggggtgac | atTTTTTggg | 60 |
| | gtcacgctgt | atcaaaggat | cttatccact | ggctttacct | cccatttgcc | atggttcctg | 120 |
| 15 | accagtggtg | cgatgctaac | ggcgtttggg | ccggttcggc | tactttcctt | gatgatggtt | 180 |
| | ctattgtcat | gctctacact | ggttccaccg | acaaatttgt | acaagtaatg | atTTTgaaaa | 240 |
| | tccatttggt | gcttaactaa | ccactctatt | aatgcttgtg | acagtatgga | atgtgaataa | 300 |
| | atgtttcata | aatgtaatag | tgattccaat | tcttgtgttt | ggtagcataa | aatatatttc | 360 |
| | aatataaatg | tttaaagcaa | ttagcgacaa | tatgttgttt | actacgctt | taggttcaaa | 420 |
| 20 | accttgcc | tcctgaagac | cctaaagatc | cacttttg | gaaatggacc | aagttctccg | 480 |
| | gcaacccggt | tcttgtagca | cctccaggta | tcggtgctaa | ggacttccgt | gaccaacaa | 540 |
| | ctgcatggaa | gacatcagac | gggaaatggc | ggatcactat | tggctccaaa | atcaacagaa | 600 |
| | ccggaatatc | tcttatttac | gatacaacag | atttcaagac | ctacgagaag | catgagacct | 660 |
| | tgttgacca | agtcccaaac | actggaatgt | gggagtgctg | tgacttttat | ccagtgtcca | 720 |
| 25 | agactaaaga | caagggtctt | gacacttcgg | tcaatggacc | ggatgttaag | catatcatta | 780 |
| | aggctagcat | ggacgatact | agaattgacc | attatgcat | tgggacatac | tatgactcta | 840 |
| | atgcaacatg | ggtccccgat | aatccttcaa | tcgatgtcgg | gattagtacc | ggtttgagat | 900 |
| | atgattacgg | taaattttac | gcaaccaaga | ccttcttcga | aagga | | 945 |
| | <210> | 29 | | | | | |
| 30 | <211> | 948 | | | | | |
| | <212> | DNA | | | | | |
| | <213> | Brassica napus | | | | | |

| | | | |
|----|-------|--|-----|
| | <400> | 29 | |
| | | tccttcactt gttttatcaa tataacccaa atgcagccgt gtggggtgac attgtttggg | 60 |
| | | gtcacagtgt ctaaagatct tatccattgg cttcacctcc cgtttgcaat ggttcctgac | 120 |
| | | caatggtacg acgctaacgg tgtttggacc ggttcggcta ctttcctcga tgatggttct | 180 |
| 5 | | attgcatgc tctacactgg atccaccgac aaattcgtac aagtattact tttaaaacca | 240 |
| | | tttctctggt aaataagtat ttgattcata atgcttttga tatgatatca ataaatcttt | 300 |
| | | tgatatactg gtgacagatt tatataaaac gtaattaatt ctttataaat cgtttcatat | 360 |
| | | aagattttat cggaccaatt aacgataata atattagcta ttattatggt tttaggttca | 420 |
| | | aaaccttgcc tatcctgagg accccaatga tccacttttg ttgaaatgga ccaagttctc | 480 |
| 10 | | tggcaaccg gttctcgaac cgctccagg tatcggatg aaggacttcc gtgaccaac | 540 |
| | | aactgcgtgg aagacatcag acggaaaatg gcggatcact atcggctctcc aaaatcaata | 600 |
| | | gaaccggaat atcccttggt tatgacacag tcgatttcaa gacctacgag aaacacgata | 660 |
| | | tcttgttgca ccaagtccca aacactggaa tgtgggagtg cgttgacttt tatccggtgt | 720 |
| | | caaagactaa gcaccacggt cttgacctt cagttaatgg accggatggt aggcataatag | 780 |
| 15 | | tgaaagctag catggacgat acaagaattg accatthtgc cattgggacg tactatgatt | 840 |
| | | ctaattggaac atgggtcccg gataatcctt caattgatgt cgggattagt accggttga | 900 |
| | | gatacgatta cggtaaattht tacgcatcca aaaccttcta cgaaagga | 948 |
| | <210> | 30 | |
| | <211> | 894 | |
| 20 | <212> | DNA | |
| | <213> | Brassica napus | |
| | <400> | 30 | |
| | | tccttcacct gttttatcag tacaacccaa atgcagccgt gtggggtgac attgtttggg | 60 |
| | | gtcacgctgt atcaaaggat cttatccact ggctttacct cccatttgcc atggttctctg | 120 |
| 25 | | accaatggta cgatgctaac ggcgtttggg ccggttcagc tactttcctt gatgatggtt | 180 |
| | | ctattgtcat gctctacact ggttccaccg acaaattcgt acaggtaatg attttataaa | 240 |
| | | tccatttatt gttcattaa tcactttagt aatgcttctg acagtataaa acgtgaataa | 300 |
| | | ttgtttcata attaatatgg attccaattc ttgtgttaat gttgttattt actacgcttt | 360 |
| | | taggttcaaa accttgccca tcctgaagac ccaaaagatc cacttttggt gaaatggacc | 420 |
| 30 | | aagttctccg gcaaccgggt tcttgtacca cctccaggta tcggtgctaa ggacttccgt | 480 |
| | | gaccaacaaa ctgcatggaa gacttcagac gggaaatggc ggatcactat tggctccaaa | 540 |
| | | atcaacagaa ccggaatatc tcttatttac gatacaacag atttcaagac ctacgagaaa | 600 |

| | | | | | | | |
|----|------------|----------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| | catgagacct | tgttgcacca | agtcccaaac | actggaatgt | gggagtgtgt | tgacttttat | 660 |
| | ccagtgtcca | agactaaaga | caagggtcct | gacacttcgg | tcaatggacc | ggatgttaag | 720 |
| | catatcatta | aggctagcat | ggacgatact | agaattgacc | attatgccat | tgggacatac | 780 |
| | tatgactcta | atgcaacatg | ggtccccgac | aatccttcaa | tcgatgtcgg | gattagtacc | 840 |
| 5 | ggtttgagat | atgattacgg | taaattttac | gctccaagac | cttctttgaa | agga | 894 |
| | <210> | 31 | | | | | |
| | <211> | 939 | | | | | |
| | <212> | DNA | | | | | |
| | <213> | Brassica napus | | | | | |
| 10 | <400> | 31 | | | | | |
| | tccttcactt | tttctaccag | tataacccaa | atgcagccgt | gtggggtgac | attgtttggg | 60 |
| | gtcacgcagt | gtctaaagat | cttatccatt | ggcttcacct | cccgtttgca | atggttcctg | 120 |
| | accaatggta | cgacgctaac | ggtgtttggg | ccggttcggc | tactttcctc | gatgatggtt | 180 |
| | ctattgtcat | gctctacact | ggatccaccg | acaaattcgt | acaagtatta | ctttttaaaa | 240 |
| 15 | ccatttctct | gttaaataag | tatttgattc | ataattcttt | tgatatgata | tcaataactc | 300 |
| | ttttgatata | ctggtgacag | atztatataa | aacttaatta | attctttaaa | aatcatttca | 360 |
| | aaataagatt | ttatcggacc | aattagcgat | aataatatta | gctattatta | tgtttttagg | 420 |
| | ttcaaacct | tgctatcct | gaggaccca | atgatccact | ttgttgaaa | tggaccaagt | 480 |
| | tctctggcaa | cccggttctc | gaaccgcctc | caggatcgg | tgataaggac | ttccgtgacc | 540 |
| 20 | caacaactgc | gtggaagaca | tcagacggaa | aatggcggat | cactatcggc | tccaaaatca | 600 |
| | atagaaccgg | aatatccctt | gtttatgaca | ccgtcgattt | caagacctac | gagaaacacg | 660 |
| | acatcttggt | gcaccaagtc | ccaacacag | gaatgtggga | gtgcgttgac | ttttatccgg | 720 |
| | tgtcaaagac | taagcaccac | ggtcttgaca | cttcagttaa | tggaccggat | gttaggcata | 780 |
| | tagtgaaagc | tagcatggac | gatacaagaa | ttgaccatta | tgccattggg | acgtactatg | 840 |
| 25 | attctaattg | aacgtgggtc | ccggataatc | cttcaattga | tgttgggatt | agtaccggtt | 900 |
| | tgagatacga | ttacggtaaa | ttttacgcat | caaaaacca | | | 939 |
| | <210> | 32 | | | | | |
| | <211> | 710 | | | | | |
| | <212> | DNA | | | | | |
| 30 | <213> | Brassica napus | | | | | |
| | <400> | 32 | | | | | |
| | tccttcactt | tttttatcag | tacaaccctg | attcagctat | ttggggaaat | atcacatggg | 60 |

| | | |
|----|---|-----|
| | gccatgcaat atccacggac ttgatccatt ggctttactt gcccttcgcc ttggttcctg | 120 |
| | atcaatggta cgatatcaac ggtgtctgga ccgggtccgc gaccttccta cccgacggtc | 180 |
| | agatcatgat gttatacacc ggtgatacca atgattacgt gcaggtgcaa aatcttgcgt | 240 |
| | accccgccaa cttatcggat cccctcctca tcgactgggt caagtaccgg ggcaaccgg | 300 |
| 5 | tcatggttcc accaccggc attggtgtca aggactttag agaccaacg actgcttga | 360 |
| | ccggaccaca aaacgggcag tggctgctta ccatcgggtc caagattggt aaaacgggta | 420 |
| | ttgcaattgt ttatggtact tccaacttca caaactttaa gctattggat ggagttttgc | 480 |
| | atgcbggttcc ggttacgggt atgtgggagt gtgtggactt ttaccggta tcaaccgatg | 540 |
| | aggcaaacgg gttggacaca tcataaacg ggccaggtat aaagcatgtg ttaaagcaa | 600 |
| 10 | gtttagatga cgataagcat gattactatg ctattgggac atatgaccg gtaaagaaca | 660 |
| | aatggactcc tgataaccg caattggatg tgggtatcgg gttgagacta | 710 |
| | <210> 33 | |
| | <211> 753 | |
| | <212> DNA | |
| 15 | <213> Brassica napus | |
| | <400> 33 | |
| | tccttcactt gttttatcag tacaaccctg attcagctat ttggggaaat atccatggg | 60 |
| | gccatgcaat atccacggac ttgatccatt ggctttactt gcccttcgcc ttggttcctg | 120 |
| | atcaatggta cgatatcaac ggtgtctgga ccgggtccgc gaccttccta cccgacggtc | 180 |
| 20 | agatcatgat gttatacacc ggtgatacca atgattacgt gcaggtgcaa aatcttgcgt | 240 |
| | accccgccaa cttatcggat cccctcctca tcgactgggt caagtaccgg ggcaaccgg | 300 |
| | tcatggttcc accaccggc attggtgtca aggactttag agaccaacg actgcttga | 360 |
| | ccggaccaca aaacgggcag tggctgctta ccatcgggtc caagattggt aaaacgggta | 420 |
| | ttgcaattgt ttatggtact tccaacttca caaactttaa gctattggat ggagttttgc | 480 |
| 25 | atgcbggttcc ggttacgggt atgtgggagt gtgtggactt ttaccggta tcaaccgatg | 540 |
| | aggcaaacgg gttggacaca tcataaacg ggccaggtat aaagcatgtg ttaaagcaa | 600 |
| | gtttagatga cgataagcat gattactatg ctattgggac atatgaccg gtaaagaaca | 660 |
| | aatggactcc tgataaccg caattggatg tgggtatcgg gttgagactg gactacggga | 720 |
| | aatactacgc aaccaaaacc ttcttcgaaa gga | 753 |
| 30 | <210> 34 | |
| | <211> 753 | |
| | <212> DNA | |

<213> Brassica napus

<400> 34

tccttcactt gttttaccag tataaccctg attcagctat ttggggaaat atcacatggg 60
 gccatgcaat atccacggac ttgatccatt ggctttactt gcccttcgcc ttggttcctg 120
 5 atcaatggta cgatatcaac ggtgtctgga cgggtccgc gaccttcta cccgacggtc 180
 agatcatgat gttatacacc ggtgatacca atgattacgt gcaggtgcaa aatcttgcgt 240
 accccgcaa cttatcggat cccctcctca tcgactgggt caagtaccgg ggcaaccgg 300
 tcatggttcc accaccggc attggtgtca aggactttag agaccaacg actgcttga 360
 ccggaccaca aaacgggcag tggctgctta ccatcgggtc caagattggt aaaacgggta 420
 10 ttgcaattgt ttatgtact tccaacttca caaacttta gctattggat ggagttttgc 480
 atgcggttcc gggtaggggt atgtgggagt gtgtggactt ttaccggta tcaaccgatg 540
 aggcaaacgg gttggacaca tcatataacg ggccaggtat aaagcatgtg ttaaagcaa 600
 gtttagatga cgataagcat gattactatg ctattgggac atatgaccg gtaaagaaca 660
 aatggactcc tgataaccg caattggatg tgggtatcgg gttgagactg gactacggga 720
 15 aatactacgc atccaaaacc ttcttcgaaa gga 753

<210> 35

<211> 753

<212> DNA

<213> Brassica napus

20 <400> 35

tccttcactt gttctatcag tataaccctg attcagctat ttggggaaat atcacatggg 60
 gccatgcaat atccacggac ttgatccatt ggctttactt gcccttcgcc ttggttcctg 120
 atcaatggta cgatatcaac ggtgtctgga cgggtccgc gaccttcta cccgacggtc 180
 agatcatgat gttatacacc ggtgatacca atgattacgt gcaggtgcaa aatcttgcgt 240
 25 accccgcaa cttatcggat cccctcctca tcgactgggt caagtaccgg ggcaaccgg 300
 tcatggttcc accaccggc attggtgtca aggactttag agaccaacg actgcttga 360
 ccggaccaca aaacgggcag tggctgctta ccatcgggtc caagattggt aaaacgggta 420
 ttgcaattgt ttatgtact tccaacttca caaacttta gctattggat ggagttttgc 480
 atgcggttcc gggtaggggt atgtgggagt gtgtggactt ttaccggta tcaaccgatg 540
 30 aggcaaacgg gttggacaca tcatataacg ggccaggtat aaagcatgtg ttaaagcaa 600
 gtttagatga cgataagcat gattactatg ctattgggac atatgaccg gtaaagaaca 660
 aatggactcc tgataaccg caattggatg tgggtatcgg gttgagactg gactacggga 720

| | | |
|----|--|-----|
| | aatactacgc ttccaaaacc ttctacgaaa gga | 753 |
| | <210> 36 | |
| | <211> 753 | |
| | <212> DNA | |
| 5 | <213> Brassica napus | |
| | <400> 36 | |
| | tccttcactt gttctatcag tataaccctg attcagctat ttggggaaat atcacatggg | 60 |
| | gccatgcaat atccacggac ttgatccatt ggctttactt gcccttcgcc ttggttcctg | 120 |
| | atcaatggta cgatatcaac ggtgtctgga ccgggtccgc gaccttccta cccgacggtc | 180 |
| 10 | agatcatgat gttatacacc ggtgatacca atgattacgt gcaggtgcaa aatcttgcgt | 240 |
| | accccccaa cttatcggat cccctcctca tcgactgggt caagtaccgg ggcaaccggg | 300 |
| | tcatggttcc accaccggc attggtgtca aggactttag agaccaacg actgcttggg | 360 |
| | ccggaccaca aaacgggcag tggtctgcta ccatcgggtc caagattggt aaaacgggta | 420 |
| | ttgcaattgt ttatggtact tccaacttca caaacttaa gctattggat ggagttttgc | 480 |
| 15 | atgcbggttcc gggtaggggt atgtgggagt gtgtggactt ttaccgggta tcaaccgatg | 540 |
| | aggcaaacgg gttggacaca tcatataacg ggccaggtat aaagcatgtg ttaaagcaa | 600 |
| | gtttagatga cgataagcat gattactatg ctattgggac atatgaccgg gtaaagaaca | 660 |
| | aatggactcc tgataaccgg caattggatg tgggtatcgg gttgagactg gactacggga | 720 |
| | aatactacgc ttccaaaacc ttcttcgaaa gga | 753 |
| 20 | <210> 37 | |
| | <211> 34 | |
| | <212> DNA | |
| | <213> artificial sequence | |
| | <220> | |
| 25 | <223> primer | |
| | <400> 37 | |
| | ctgaggtacc tcgagcctga aatggcttct tctc | 34 |
| | <210> 38 | |
| | <211> 34 | |
| 30 | <212> DNA | |
| | <213> artificial sequence | |
| | <220> | |

<223> primer
 <400> 38
 ctgatctaga gggccctcat tcaacaaggc gatc 34
 <210> 39
 5 <211> 35
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> primer
 10 <400> 39
 ctgaggtacc ctcgagaaga tgaagatgat gaagg 35
 <210> 40
 <211> 34
 <212> DNA
 15 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> primer
 <400> 40
 gatctctaga gggccctcaa agcaacattc tcac 34
 20 <210> 41
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 25 <223> primer
 <400> 41
 gatgtacacg ttttggtgtg gg 22
 <210> 42
 <211> 22
 30 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>

<223> primer
 <400> 42
 gcttacgtgt ttagggaaat gg 22
 <210> 43
 5 <211> 27
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> primer
 10 <400> 43
 ggacggtacc ctgcaacgaa gtgtacc 27
 <210> 44
 <211> 30
 <212> DNA
 15 <213> artificial sequence
 <220>
 <223> primer
 <400> 44
 gcaggtaccg taattctgat tttattcaag 30
 20 <210> 45
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>
 25 <223> primer
 <400> 45
 gatcgggtacc tcgaattgtg atatattgta agc 33
 <210> 46
 <211> 33
 30 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <220>

<223> primer

<400> 46

catggggtac cctgattaat tagcaattag tgg

33

REIVINDICAÇÕES

1. Método para aumentar a proporção de broto para raiz de uma planta compreendendo a etapa de
- 5 inibir a atividade de uma invertase no tecido da raiz da referida planta.
2. Método para aumentar a produção de semente de uma planta compreendendo a etapa de
- inibir a atividade de uma invertase no tecido da raiz da referida planta.
- 10 3. Método para aumentar a resistência a uma doença de uma planta compreendendo a etapa de
- inibir a atividade de uma invertase no tecido da raiz da referida planta.
- 15 4. Método de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 3, em que a atividade da invertase é inibida ou por
- (d) um *knock-down* da invertase ou
- (e) nocaute da invertase, ou
- (f) um inibidor para a invertase.
- 20 5. Método de acordo com a reivindicação 4, em que o inibidor é ativo no tecido da raiz da planta.
6. Método de acordo com a reivindicação 4 ou 5, em que o inibidor é um polipeptídeo.
7. Método de acordo com quaisquer das reivindicações 4 a 6, em que o inibidor é codificado por um ácido nucléico.
- 25 8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o ácido nucléico está sob o controle de um elemento de transcrição e/ou um elemento de translação, por meio da qual o referido elemento de transcrição e/ou o referido elemento de translação possibilita a transcrição e/ou translação específica do ácido nucléico em tecido da raiz.
- 30 9. Método de acordo com a reivindicação 8, por meio da qual o elemento de transcrição é um promotor, preferencialmente um promotor específico para raiz.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, por meio da qual o promotor é um promotor indutível.

11. Método de acordo com a reivindicação 9 ou 10, por meio da qual o promotor é selecionado entre o grupo compreendendo promotor pyk10, promotor T80-críptico, e promotor WRKY6.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, por meio da qual o promotor é promotor T80-críptico.

13. Método de acordo com quaisquer das reivindicações 4 a 12, em que o inibidor é selecionado entre o grupo compreendendo inibidores de invertase de tabaco e inibidores de invertase de Arabidopsis, por meio da qual, preferencialmente, os inibidores de invertase de tabaco são selecionados entre o grupo compreendendo NT-CIF1, Y12805; Nt-VIF, AY145781 e/ou os inibidores de invertase de Arabidopsis são selecionados entre o grupo compreendendo AtC/VIF1, At1g47960; AtC/VIF2, At5g64620, e AtC/VIF3, At3g17130.

14. Método de acordo com a reivindicação 4, em que o *knock-down* é causado por silenciamento e/ou co-supressão de gene pós-transcricional.

15. Método de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 14, em que a invertase é uma invertase selecionada entre o grupo compreendendo uma invertase solúvel, uma invertase vacuolar, uma invertase neutra / alcalina e uma invertase citoplasmática.

16. Método de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 14, por meio da qual a invertase é uma invertase selecionada entre o grupo compreendendo uma invertase ligada à parede celular, e uma invertase extracelular, apoplásmica mas não ligada à parede celular, por meio da qual preferencialmente a invertase é uma invertase ligada à parede celular.

17. Método de acordo com a reivindicação 15, em que a invertase é uma invertase tendo uma seqüência de aminoácidos, por meio da qual a seqüência de aminoácidos é codificada por um ácido nucléico o qual é selecionado entre o grupo de seqüências de ácido nucléico compreendendo seqüências de ácido nucléico SEQ. ID. Nº 1 a 14.

18. Método de acordo com a reivindicação 16, em que a invertase é uma invertase tendo uma seqüência de aminoácidos, por meio da qual a seqüência de aminoácidos é codificada por um ácido nucléico o qual é selecionado entre o grupo de seqüências de ácido nucléico compreendendo seqüências de ácido nucléico SEQ. ID. Nº 15 a 36.

19. Método de acordo com quaisquer das reivindicações 4 a 18 na extensão em que as reivindicações se referem à reivindicação 3, em que a doença da planta é uma doença envolvendo ou afetando o tecido da raiz

20. Método de acordo com quaisquer das reivindicações 4 a 19 na extensão em que as reivindicações se referem à reivindicação 3, em que a doença da planta é transferida ou causada por um patógeno.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, em que o patógeno é selecionado entre o grupo compreendendo *Plasmodiophora brassicae*, *Verticillium* e nematódeos, por meio da qual o nematódeo preferencialmente é *Heterodera schachtii* Schm.

22. Método de acordo com quaisquer das reivindicações 19 a 21, em que a doença é selecionada entre o grupo compreendendo doenças as quais são causadas por ou associadas com um organismo selecionado entre o grupo compreendendo *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora syringae* P. *undulata*, *Oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Meloidogyne hapla*, *Phytophthora quercina* e *Rhizoctonia solani* Kühn.

23. Método de acordo com quaisquer das reivindicações 1 a 22, em que a planta é um membro da família de *Brassicaceae*.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, em que a planta é selecionada entre o grupo compreendendo colza, repolho e couve chinesa.

25. Molécula de ácido nucléico, preferencialmente codificando para uma invertase, tendo uma seqüência de ácido nucléico, por meio da qual a seqüência de ácido nucléico é selecionada entre o grupo de seqüências de ácido nucléico SEQ. ID. Nº 1 a 36, ou um ácido nucléico essencialmente complementar a essas.

26. Molécula de ácido nucléico a qual hibridiza, preferencialmente sob condições estridentes, à seqüência de ácido nucléico de acordo com

a reivindicação 25.

27. Molécula de ácido nucléico a qual, para para a degeneração do código genético, hibridizaria, preferencialmente sob condições estridentes, ao ácido nucléico de acordo com a reivindicação 25 ou 26.

5 28. Polipeptídeo, preferencialmente uma invertase, codificado por uma molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 25 a 27.

29. Vetor compreendendo uma molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 25 a 27.

10 30. Vetor de acordo com a reivindicação 29, por meio da qual o vetor é um vetor de planta, mais preferencial um vetor de expressão vegetal.

31. Vetor de acordo com a reivindicação 30, em que o vetor compreende um promotor específico para raiz.

15 32. Célula, preferencialmente uma célula de planta, compreendendo molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 25 a 27 e/ou um vetor de acordo com quaisquer das reivindicações 29 a 31.

20 33. Tecido e/ou um órgão compreendendo uma molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 25 a 27 e/ou um vetor de acordo com quaisquer das reivindicações 29 a 31 e/ou uma célula de acordo com a reivindicação 32.

34. Tecido e/ou órgão de acordo com a reivindicação 33, em que o tecido é um tecido da raiz e/ou o órgão é uma raiz.

25 35. Organismo, preferencialmente uma planta, compreendendo uma molécula de ácido nucléico de acordo com quaisquer das reivindicações 25 a 27 e/ou um vetor de acordo com quaisquer das reivindicações 29 a 31 e/ou uma célula de acordo com a reivindicação 32.

30 36. Uso de um constructo de ácido nucléico para a modificação do genoma de uma planta, por meio da qual o constructo compreende

- (i) um promotor específico para raiz; e
- (j) um ácido nucléico codificando para um inibidor de invertase,

em que o promotor e o ácido nucléico codificando para a invertase são encadeados operavelmente um ao outro.

37. Uso de um constructo de ácido nucléico para inibir a atividade ou presença de uma invertase, preferencialmente uma invertase em raiz e/ou tecido da raiz, por meio da qual o constructo compreende

- (k) um promotor específico para raiz; e
- (l) um ácido nucléico codificando para um inibidor de invertase,

em que o promotor e o ácido nucléico codificando para a invertase são encadeados operavelmente um ao outro.

38. Uso de um constructo de ácido nucléico para aumentar a proporção de broto para raiz, produção de sementes e/ou resistência a doença de uma planta, por meio da qual o constructo compreende

- (m) um promotor específico para raiz; e
- (n) um ácido nucléico codificando para um inibidor de invertase,

em que o promotor e o ácido nucléico codificando para a invertase são encadeados operavelmente um ao outro.

39. Uso de um constructo de ácido nucléico para a fabricação de um medicamento para o tratamento de uma planta doença, por meio da qual o constructo compreende

- (o) um promotor específico para raiz; e
- (p) um ácido nucléico codificando para um inibidor de invertase,

em que o promotor e o ácido nucléico codificando para a invertase são encadeados operavelmente um ao outro.

40. Uso de acordo com a reivindicação 39, por meio da qual o medicamento é para terapia genética de uma planta.

41. Uso de acordo com a reivindicação 40, por meio da qual a planta é uma célula de planta ou um tecido de planta, preferencialmente antes de regeneração para uma planta madura.

42. Uso de um constructo de ácido nucléico para a produção de

uma planta transgênica, por meio da qual a planta transgênica preferencialmente apresenta um ou mais de um aumento na proporção de broto para raiz, aumento na produção de sementes e aumento na resistência a patógenos e/ou doenças.

5 43. Uso de um polipeptídeo de acordo com a reivindicação 28 como uma molécula alvo.

 44. Uso de acordo com a reivindicação 43, em que o polipeptídeo é uma molécula alvo para um inibidor *in vitro* e/ou *in vivo*.

10 45. Uso de acordo com a reivindicação 43 ou 44, em que a molécula alvo é uma molécula alvo no tecido da raiz de uma planta.

 46. Uso de acordo com a reivindicação 43, em que a molécula alvo é usada em um método de triagem para a identificação de um agente de proteção vegetal.

15 47. Uso de acordo com a reivindicação 43, em que a molécula alvo é usada em um método de triagem para a identificação de um promotor de crescimento vegetal.

Fig. 1

| | Cloning | AtcwINV1 At3g13790 pI=9.5 | AtcwINV2 At3g52600 pI=9.7 subgroup 1 2 | | AtcwINV3 At1g55120 pI=5.5 subgroup 1 2 | | AtcwINV4 At2g3619 0 pI=8.1 | AtcwINV5 At3g1378 4 pI=9.3 | AtcwINV6 At5g11920 pI=4.8 |
|--|----------------------|--|---|------------------|---|------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| | RT genomic DNA | - (X) I50 J70 Q48 R3 T80 | B69 | - | A1 G2 P71 | - | - | - | - |
| | RT | - | RT1 RT3 RT36 RT37 | - | - | RT2 | - | - | - |
| | Genomic DNA | 410_18 410_50 | - | 410_17 410_19 | - | 410_49 410_52 | 410_51 | - | - |

(X) = little homology, pI 5.4
 RT means revers transcribed RNA, isolated from the anthers

Fig. 2

| Cloning from | AtcwINV6 At5g11920 | put At1g12240 | Put At1g62660 | Nicotiana vacuolar |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------|--|---|
| RT | - | - | - | X RTA4vac RTC46vac RTD75vac RTE72vac RTF2vac |
| Genomic DNA | XX D20vac | - | XXX E6vac K28vac M12vac N39vac O42vac S10vac | - |
| RT | - | RT4vac? RT35vac RT39vac | - | - |
| Genomic DANN | - | - | - | - |

X = are all identical, RT4Avac is too short

XX = Homolgy to the above specified is interrupted

XXX = containing intron(s) as in a vacuolar invertase from Arabidopsis

RT means reverse transcribed RNA isolated from the anthers

Fig. 3

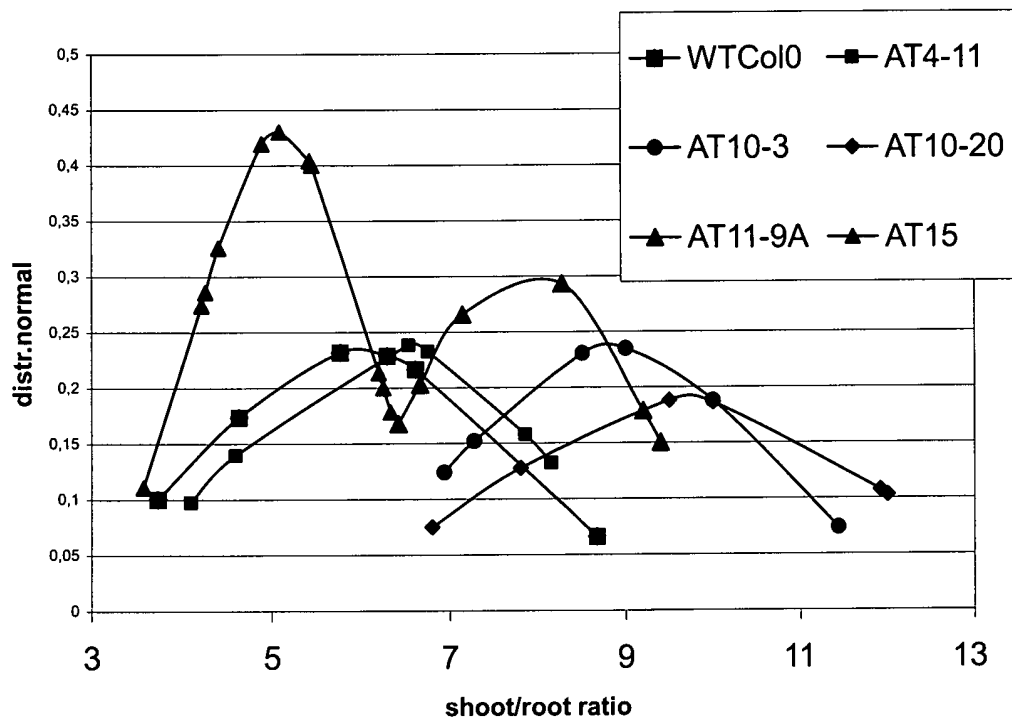


Fig. 4

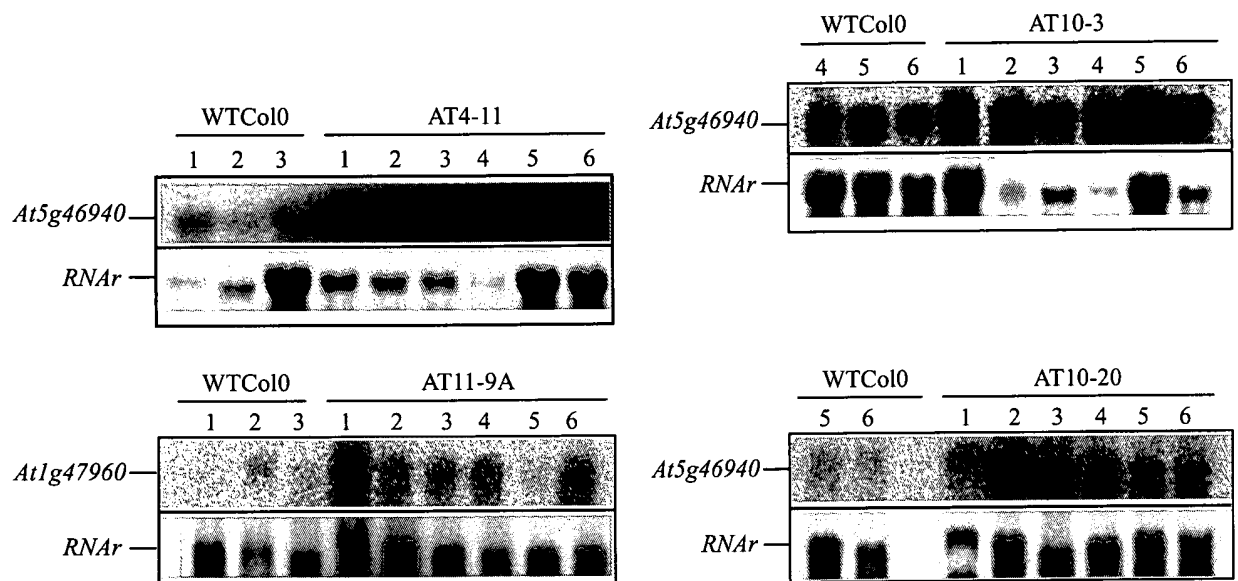


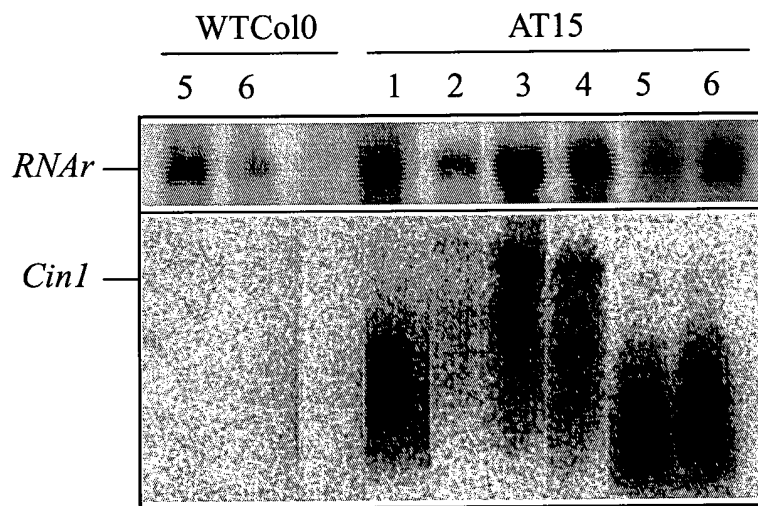
Fig. 5

Fig. 6

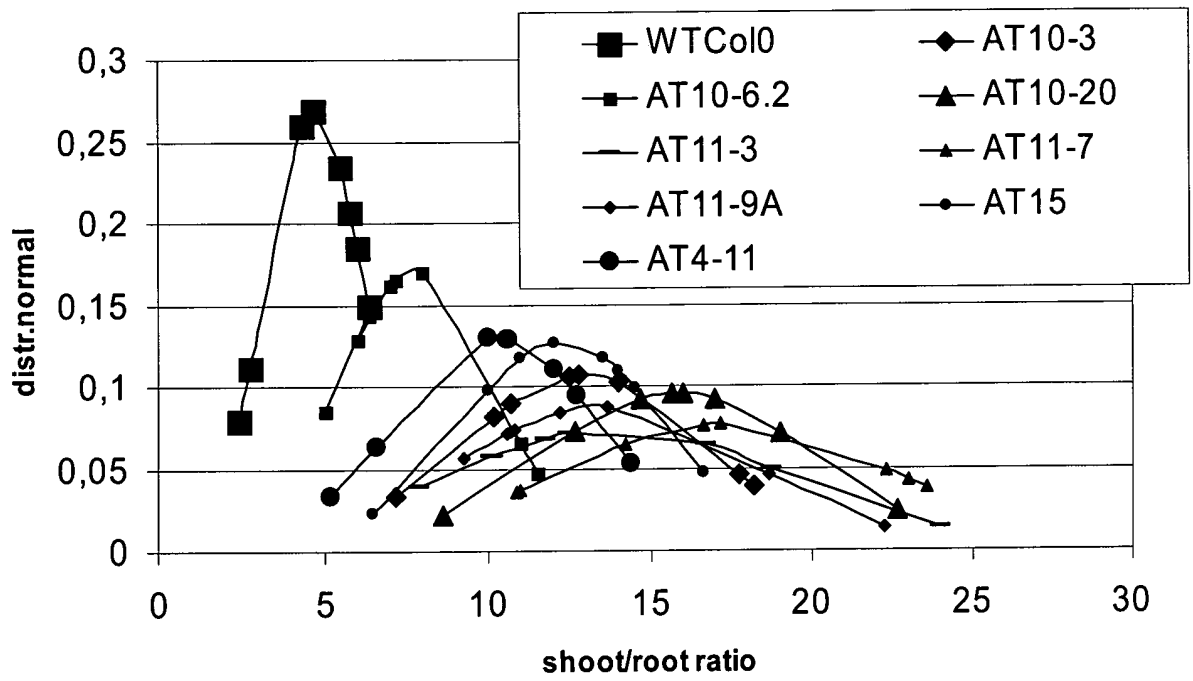
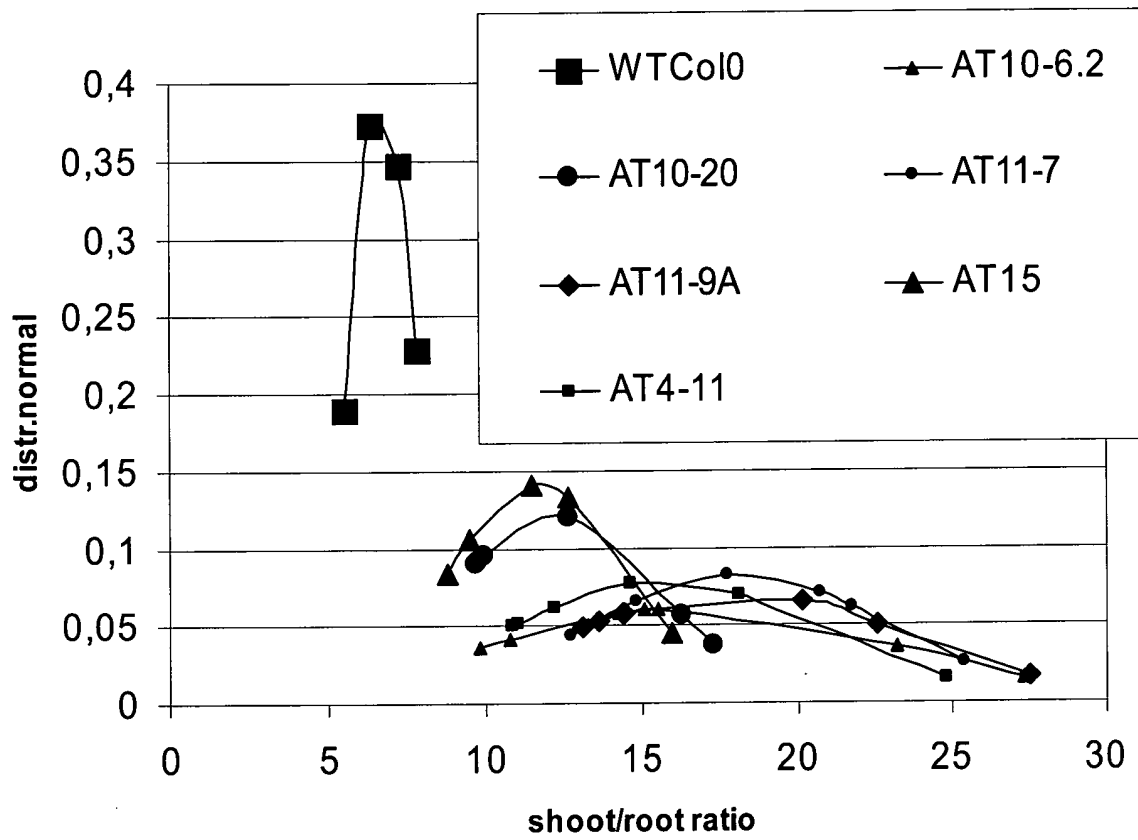


Fig. 8



9/41

Fig. 9

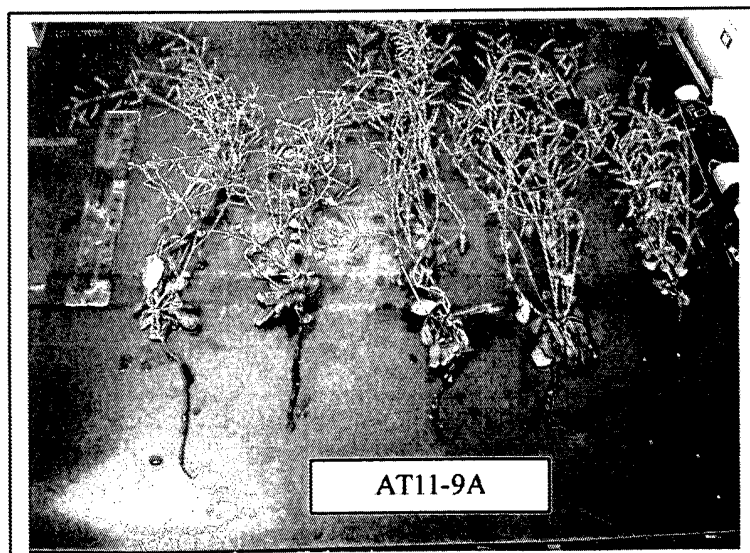
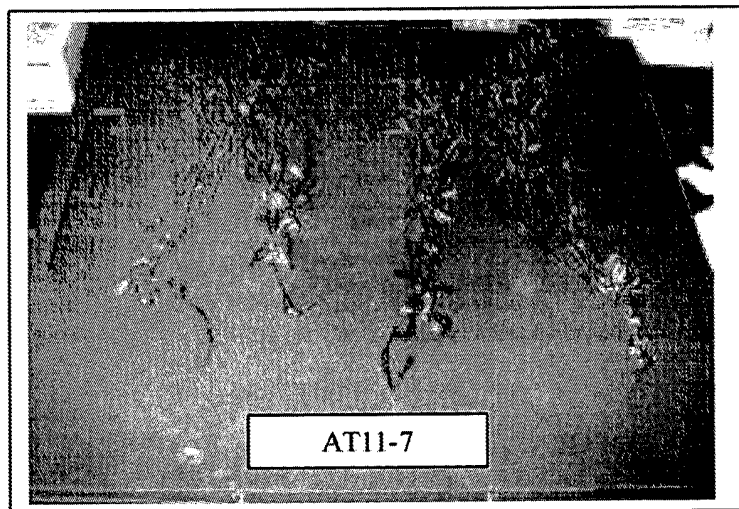
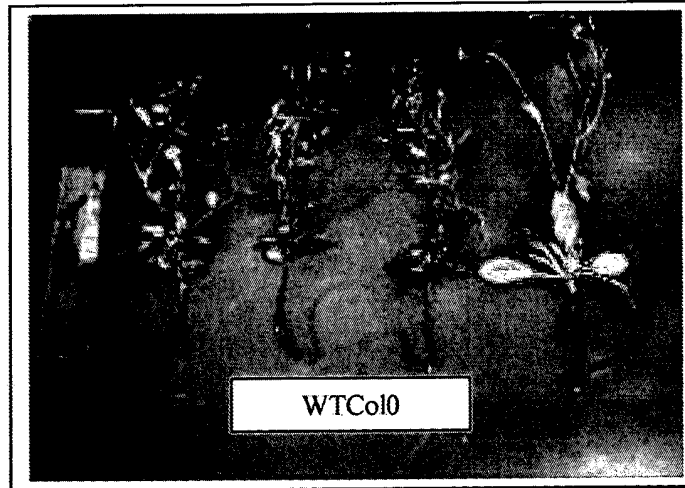


Fig. 10



Fig. 11

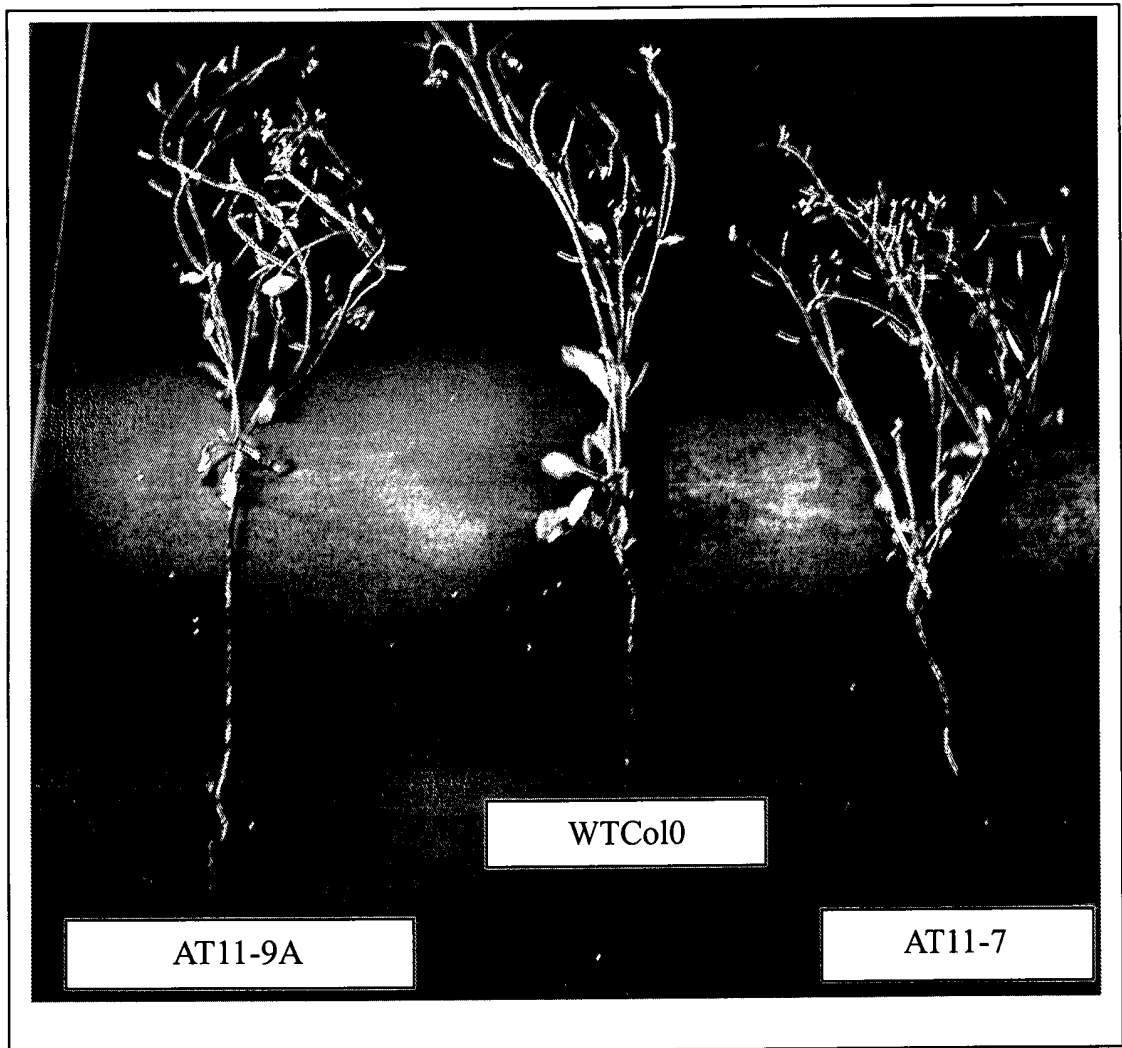


Fig. 12

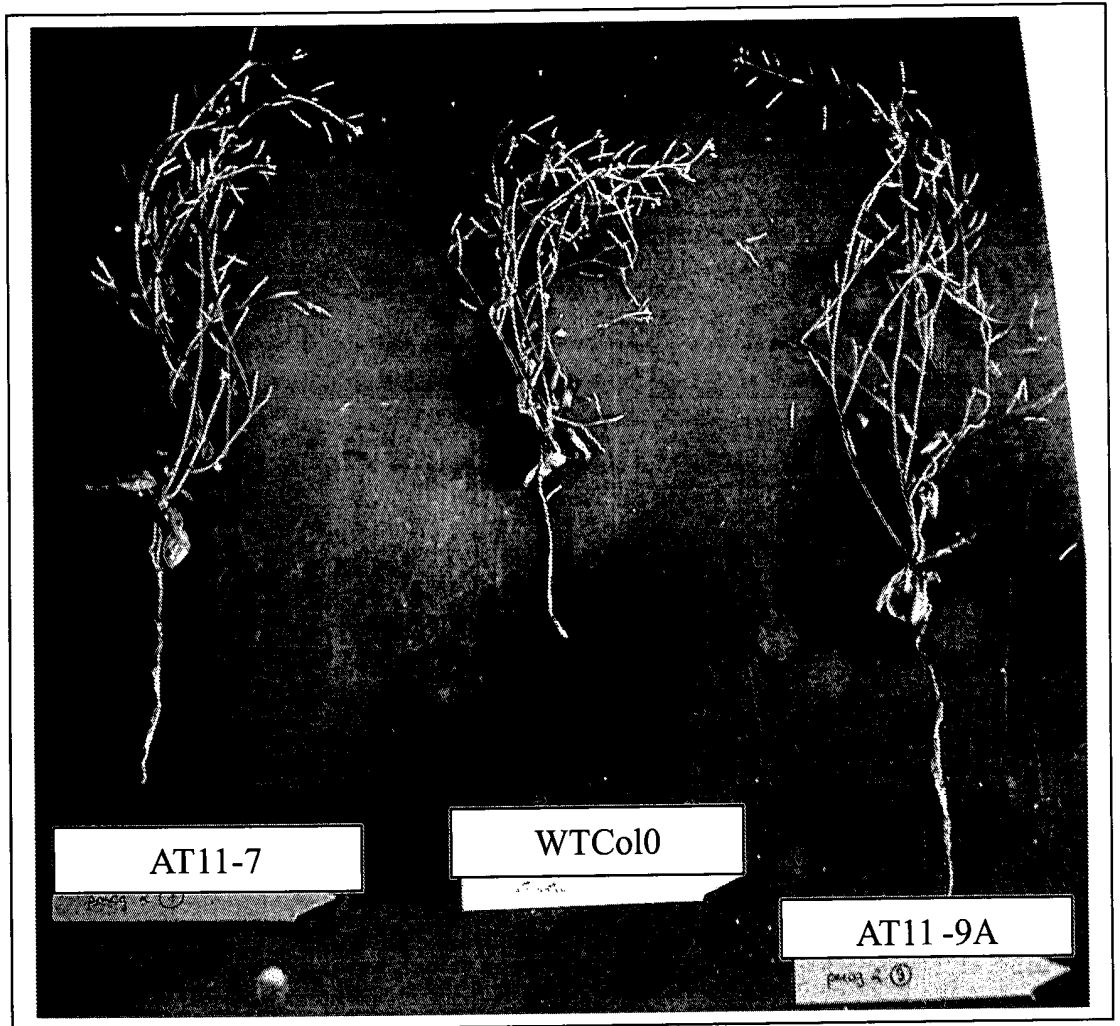


Fig. 13/1

Cell wall bound invertases

>RapsRT 1: SEQ. ID. No. 1
 GATCCATCGACTGCCTGGTTCAACAAAAAGATGGGTACTGAGAAATGCTTGTGGGCTCAAAGAACAAGCGTAGAGGAATTGCTTATATGTACAAAAGTC
 GTGACTTCAAGAAATGGGTCAAACCTAGACGTCCCGTACACACTAGAAAAGCAACCGGTATGTGGGAATGTCCCGACTTTTCCCGGTTCCATTTGGCAA
 GAAACCGGTTTACAGACCAGCTATGACGGTCCAAACACCAAGCATGTGTTGAAGGTTAGCTTGGACCTGACCAGGTACGAGTACTACACTCTTGGAAACG
 TATGATACTAAGAAGGATCGTTACAAGCCTGATGGTACCAGTCTGTATGGTTGGGATGGTTTGGACTAGATTATGGTAACTTCTATGCGTCGAAGTCTT
 CTCTTGA

>RapsRT 2: SEQ. ID. No. 2
 GACCCCAACGGCCTGGCTTGGACGTGACGGAGAATGGCGAGTAATCGTCGGAAGCTCGACGGACGATCGACGAGGATTAGCGATTCTTTACAAAAGCA
 GAGATTTCTTCAACTGGACGCAATCAACGAAGCCTTACATTACGAAGACTTAACCGGAATGTGGGAATGTCTGATTTTTTCCCGGTTTCGATAACCGG
 ATCGGACGGTGTAGAAGCGTCTCGGTTGGTGAAGATGGGATTAAGCATGTGCTTAAAGTGAAGTTGATTGAGACATTGCATGTTTAAATACACGATTGGG
 AGTTATGATCGTGAGAAAGATGTTTACGTACCGGATCTTGGGTTTGTGCAAAAACGAATCAACTCCGAGGTTAGATTACGGGAAATATTACCGTCCAAGT
 CGTTCTTCGA

>RapsRT 3: SEQ. ID. No. 3
 GATCCGACTCTGCTTGGTTCAACAAAAAGATGGGTACTGAGAAATGCTTGTGGGCTCAAAGAACAAGCGTAGAGGAATTGCTTATATGTACAAAAGTC
 GTGACTTCAAGAAATGGGTCAAACCTAGACGTCCCGTACACACTAGAAAAGCAACCGGTATGTGGGAATGTCCCGACTTTTCCCGGTTCCATCGGCAA
 GAAACCGGTTTACAGACCAGCTATGACGGTCCAAACACCAAGCATGTGTTGAAGGTTAGCTTGGACCTGACCAGGTACGAGTACTACACTCTTGGAAACG
 TATGATACTAAGAAGGATCGTTACAAGCCTGATGGTACCAGTCTGTATGGTTGGGATGGTTTGGACTAGATTATGGTAACTTCTATGCATCGAAAACCT
 TCTACGA

>RapsRT4: SEQ. ID. No. 4
 GACCCGACGACTGCTTGGAAAGACATCAGCCGAAAAATGGCGGATCACTATTGGTTCCAAGATCAACAGAACCGGGATCTACTCGTGTACGACACGACTG
 ACTTCAAGACTTACGAGAACTCGACACATTGTTGCAAAAAGTTCAAACACCGGGATGTGGGAGTGTCTGACTTTTATCTGTGTCTAAGACCTTGGT
 TAAGGGGCTCGACTCATCGGTCAATGGACAGATGTGAAGCACATCGTGAAGGCTAGTATGGACGACACCAGAAATCGACCATATGCCATAGGAACATAT
 TTCGATTCAACGGGACGTGGATCCCGGATGATCTACTATTGATGTTGGGATAGTACTAGTTTAAAGATATGATTACGGAAAGTCTATGCGTCGAAGA
 CCTTTTCGA

>RapsRT 36: SEQ. ID. No. 5
 GACCCCAAGACTGCTTGGTTCAACAAAAAGATGGGCCTGGAGAATGCTTGTGGGCTCAAAGAACAAGCGTAGAGGAATTGCTTATATGTACAAAAGTC
 GTGACTTCAAGAAATGGGTCAAACCTAGACGTCCCGTACACACTAGAAAAGCAACCGGTATGTGGGAATGTCCCGACTTTTCCCGGTTCCATCGGCAA
 GAAACCGGTTTACAGACCAGCTATGACGGTCCAAACACCAAGCATGTGTTGAAGGTTAGCTTGGACCTGACCAGGTACGAGTACTACACTCTTGGAAACG
 TATGATACTAAGAAGGATCGTTACAAGCCTGATGGTACCAGTCTGTATGGTTGGGATGGTTTGGACTAGATTATGGTAACTTCTATGCGTCGAAGACCT
 TTTTCGA

>RapsRT 37: SEQ. ID. No. 6
 GACCCGACGACTGCTTGGTTCAACAAAAAGATGGGCCTGGAGAATGCTTGTGGGCTCAAAGAACAAGCGTAGAGGAATTGCTTATATGTACAAAAGTC
 GTGACTTCAAGAAATGGGTCAAACCTAGACGTCCCGTACACACTAGAAAAGCAACCGGTATGTGGGAATGTCCCGACTTTTCCCGGTTCCATCGGCAA
 GAAACCGGTTTACAGACCAGCTATGACGGTCCAAACACCAAGCATGTGTTGAAGGTTAGCTTGGACCTGACCAGGTACGAGTACTACACTCTTGGAAACG
 TATGATACTAAGAGGATCGTTACAAGCCTGATGGTACCAGTCTGTATGGTTGGGATGGTTTGGACTAGATTATGGTAACTTCTATGCGTCGAAGACTT
 TTTTCGA

>Raps410 17: SEQ. ID. No. 7
 GATCCAACACCGCTTGGTTCAACAAGGAAGATGGGTATTGGAGAATGCTTGTGGGCTCAAAGAGAAAGAACAGAGGAATTGCTTATATGTACAAAGGCC
 GTGACTTCAAGAAATGGGTCAAAGGCAAACTCCTAACCTCAAGAAAGAAAACCGGTATGTGGGAATGTCCCGACTTTTCCCGGTTTCGTAACCGA
 CAAGAAAACGGTTTGGACTTACGTACGACGGTCCAAACGCAAGCATGTGTTGAAGGTTAGTTTGGACTTACCAGATACGAGTACTACACTCTTGGAA
 ACGTATGACACCAAGAAGGATCGTTACAGGCCAGACGGTTACACTCCTGACGGTTGGGATGGTTTGGAGATTGATTATGGTAACTACTATGCGTCAAAAT
 CGTTCTTCGA

>Raps410 18: SEQ. ID. No. 8
 GACCCATCCACTGCTTGGCTAGGCCAAGACAAGAAATGGAGAGTATTATCGGAAGCAAGATTCACCGTCTGGACTAGCCATCACTTACACGAGTAAAG
 ACTTCTAAAATGGGAAAATCTCCAGAGCCGTCGATTACGACGACGGAAGTGGAAATGTGGGAATGTCTGATTTTTTCCCGGTCACGAGGTTTGGTTC
 TAACGGCGTGAAACGCTCTCGTTTGGTGAACCTAATGAGATTTTGAAGCACGTTGAAAATAAGTTTGGACGACACGAAACATGATTATAACACGATT
 GGTACGTACGATCGGTTAAAGATAAATTCGTACCGGACAATGTTTCAAGATGGACGGTACGGCTCCGAGATACGATACGAAAGTATTACCGCTCAAA
 AACATTCTATGA

>Raps410 19: SEQ. ID. No. 9
 GATCCGCTCCACTGCTTGGTTCAACAAAAAGATGGGTATCGGAGAATGCTTGTGGGCTCAAAGAGAAAGAACAGAGGAATTGCTTATATGTACAAAGGCC
 GTGACTTCAAGAAATGGGTCAAAGCAAACTCCTAACCTCAAGAAAGAAAACCGGTATGTGGGAATGTCCCGACTTTTCCCGGTTTCGTAACCGA
 CAAGAAAACGGTTTGGACTTACGTACGACGGTCCAAACGCAAGCATGTGTTGAAGGTTAGTTTGGACTTACCAGATACGAGTACTACACTCTTGGAA
 ACGTATGACACCAAGAAGGATCGTTACAGGCCAGACGGTTACACTCCTGACGGTTGGGATGGTTTGGAGATTGATTATGGTAACTACTATGCGTCAAAAT
 CATTTTACGA

>Raps410 49: SEQ. ID. No. 10
 GACCAACACCAGGCTTGGCTTGGACGTGACGGAGAATGGCGAGTAATCGTCGGAAGCTCGACGGACGATCGACGAGGATTAGCGATTCTTTACAAAAGCA
 GAGATTTCTTCAACTGGACGCAATCAATGAAGCCTTACATTACGAAGACTTAACCGGAATGTGGGAACGTCCTGATTTTTTCCCGGTTTCGATAACCGG
 ATCGGACGGTGTAGAACGTCGTCGGTTGGTGAAGATGGGATTAAGCGTGTGCTTAAAGTGAAGTTGATTGAGACATTGCATGATTATTACACGATTGGG
 AGTTATGATCGTGAGAAAGATGTTTACGTACCGGATCTTGGGTTTGTGCAAAAACGAATCAGCTCCGAGGTTAGATTACGGGAAATATTACCGTCCAAGT
 CCTTCTACGA

Fig. 13/2

>Raps410_50: SEQ. ID. No. 11

GATCCCACTGCCTGGCTAGGCCAAGCAAGAAATGGAGAGTGATCATCGGAAGCAAGATTACCCGTCGGACTAGCCATTACTTACACGAGTAAAG
ACTTTCTAAATGGGAAAATCTCCAGAGCCGTTGCATTACGACGACGGAAGTGGAAATGTCCTGATTTTCCAGTCACGAGGTTTGGTTC
CCGAAACGGTTGGACTTGGATTACGTCGGTCCAAACACCAAGCATGTGTTGAAGTTAGCTTGGACATTACCCGGTACGAGTATTACACGATT
GGTACGAACGATCGGGTCAAAGATAAATTCGTACCGGACAATGTTTCAAGATGGACGGTACGGTTCGGAGATACGATTATGGAAAGTATTACGCTCAA
AAACGTTCTTCGA

>Raps410_51: SEQ. ID. No. 12

GACCCGTCGACGGCGTGGTACTCCAAAGACGGGCATTGGAGAACCCTGGTAGGGTCAAAAAGAAAGCGTAGAGGAATTGCTTACATCTACAGAAGCCGAG
ATTTCAAGCATTGGGTCAAAGCTAAGCACCCGGTCTACTTAAACAGTCAACCGGTATGTTGGAAATGTCCTGATTTCTCCCGGTTTCTTAACCGATTT
CCGAAACGGTTGGACTTGGATTACGTCGGTCCAAACACCAAGCATGTGTTGAAGTTAGCTTGGACATTACCCGGTACGAGTATTACACGCTTGGTAAA
TACGATCTTAAAGAGACCGGTACATACCGGACGGTAATCTCCCGATGGTGGGAGGTTTGAGATTTCGATTACGGTAATTTCTACCGCTCAAAGTCA
TTTTCGA

>Raps410_52: SEQ. ID. No. 13

GATCCGTCCTACTGCCTGGCTGGACGTGACGGAGAATGGCGAGTAATCGTCGGAAGCTCGACGGACGATCGACGAGGATTAGCGATTCTTTACAAAAGCA
GAGATTTCTTCAACTGGACGCAATCAACGAAGCCTTTACATACGAAGACTTAAACCGGAATGTTGGAAATGTCCTGATTTTCCCGGTTTCGATAACCGGA
TCGGACGGTGTAGAAACGTCGTCGGTGGTGGGAATGGGATTAAGCATGTGCTAAAGTGAGTTGATTGGGACATTTCGATGATTATTACACGATTGGGAG
TTATGATCGTGAGAAAGATGGTTACGTACCGGATCTTGGGTTTGCAAAAAGCAATCAGCTCCGAGGTTAGATTACGGGAAATATTACCGCTCAAATCA
TTCTACGA

>RapsJörg_B69: SEQ. ID. No. 14

TCCTTCACTGTTTCTACAGTACAATCCAAAGGTGCGGTTTGGGGTAAACATTGTGTGGGCTCATTACGTTTCTAAGGACTTGATCAATTGGGAAGCTCT
TGAACCGGCTATTTACCCCTCCAAATGGTTGATATCAATGGTACATGGTCCGGTTCAGCCCAACCGTACCCGGAAAAGGACCGGTTATCTCTACACT
GGTATCCCGTAGAACCATACTCAGATCCAAAATTAATGCCATTTCCCAAAGACCTTTCCGACCCATACCTCAAGAAATGGATCAAGCCCGACGCAACCCTA
TCGTAAGACCCGACCATGGCGAGAATGGATCCGCTTCCGTGACCCGACAACCTGCTTGGTTCAAAAAGATGGGCATGGAGAATGCTTGTGGGCTC
AAAGAACAAGCGTAGAGGAATTGCTTATATGTACAAAAGTCTGACTTCAAGAAATGGGTCAAAAAGTACGCTCCCGTACACACTAGAAAAGCAACCGGT
ATGTGGGAATGTCGCGACTTTTCCCGGTTCCATCGGCAAGAAAACCGGTTTAGACACCAGCTATGACGGTCCAAACACCAAGCATGTGTTGAAGGTTA
GCTTGGACCTGACCAAGGTACGAGTACTACACTCTTGAACGATGATACTAAGAAGGATCGTTACAAGCCTGATGGTACCCTCTGATGGTGGGATGG
TTTGAAGTACTAGATTATGGTAACTTCTACGCATCAAAAACCTTCTACGAAAGGAA

>RapsJörg_A1: SEQ. ID. No. 15

TCCTTCACTGTTTATCAGTACAATCCATACGGCGCCGTTTGGGATGTAAGAATCGTGTGGGTCCTCCAGTCACTTGATCTAGTTAACTGGACCCC
ACAGCCTCCAGCATTAGTCCATCTCAGCCGTCAGACATCAACGGTTGTTGGTTCAGGCTCCGTCACGATTTACCAAACGGCACACCGGTGATCCTCTAC
ACCGGATTTGACAAAACAAAAGTCAAGTCCAAAACGTCGCGGTTCCGCTTAAACATCTCCGATCCATATCTCCGGAATGGTCAAAGTCGCGGCAAAATC
CTCTGATGGCTCCTAGACCGGTCACCGGAATCAACCCCGACCGGTTCCGAGACCCGACCCCGGTTGGCTAGGACACGACGGAGAATGGAGAGTATCGT
CGGAAGCTCGACGGACGATCGTCGAGGATTAGCGGTTCTTTACAAGAGCAGAGATTCTTCAACTGGACGCAAGCGCAAGCCCTCTTACCACGAAGAC
TTAACGGAAATGTTGGGAGTTCCTGATTTTCCCGGTTTCGATAACCGGAACGGACGGTCTCGAGACGTCGTCGTTTGGTGAGGTGAAACACGTCGCTGA
AAGTGAGTTTATCGAGACGTTGCATGATTATTACACGGTGGGAGTTACGACCCGTGAGAAGGATGTTTACGTACCGGATCATGGGTTTGTGCAAGATGG
TTCGGCTCCGAGGCTGGACTACGGGAAGTTTACGCAACCAAACCTTCTACGAAAGGA

>RapsJörg_G2: SEQ. ID. No. 16

TCCTTCACTGTTTATCAGTATAATCCATACGGCGCCGTTTGGGATGTAAGAATCGTGTGGGTCCTCCAGTCACTTGATCTAGTTAACTGGACCCC
ACAGCCTCCAGCATTAGTCCATCTCAGCCGTCAGACATCAACGGTTGTTGGTTCAGGCTCCGTCACGATTTACCAAACGGCACACCGGTGATCCTCTAC
ACCGGATTTGACAAAACAAAAGTCAAGTCCAAAACGTCGCGGTTCCGCTTAAACATCTCCGATCCATATCTCCGGAATGGTCAAAGTCGCGGCAAAATC
CTCTGATGGCTCCTAACCGGTCACCGGAATCAACCCCGACCGGTTCCGAGACCCGACCCCGGTTGGCTAGGACACGACGGAGAATGGAGAGTATCGT
CGGAAGCTCGACGGACGATCGTCGAGGATTAGCGGTTCTTTACAAGAGCAGAGATTCTTCAACTGGACGCAAGCGCAAGCCCTCTTACCACGAAGAC
TTAACGGAAATGTTGGGAGTTCCTGATTTTCCCGGTTTCGATAACCGGAACGGACGGTCTCGAGACGTCGTCGTTTGGTGAGGTGAAACACGTCGCTGA
AAGTGAGTTTATCGAGACGTTGCATGATTATTACACGGTGGGAGTTACGACCCGTGAGAAGGATGTTTACGTACCGGATCATGGGTTTGTGCAAGATGG
TTCGGCTCCGAGGCTGGACTACGGGAAGTTTACGCATCAAAAACCTTCTACGAAAGGA

>RapsJörg_P71: SEQ. ID. No. 17

TCCTTCACTTCTTTTATCAGTATAATCCATACGGCGCCGTTTGGGATGTAAGAATCGTGTGGGTCCTCCAGTCACTTGATCTAGTTAACTGGACCCC
ACAGCCTCCAGCATTAGTCCATCTCAGCCGTCAGACATCAACGGTTGTTGGTTCAGGCTCCGTCACGATTTACCAAACGGCACACCGGTGATCCTCTAC
ACCGGATTTGACAAAACAAAAGTCAAGTCCAAAACGTCGCGGTTCCGCTTAAACATCTCCGATCCATATCTCCGGAATGGTCAAAGTCGCGGCAAAATC
CTCTGATGGCTCCTAACCGGTCACCGGAATCAACCCCGACCGGTTCCGAGACCCGACCCCGGTTGGCTAGGACACGACGGAGAATGGAGAGTATCGT
CGGAAGCTCGACGGACGATCGTCGAGGATTAGCGGTTCTTTACAAGAGCAGAGATTCTTCAACTGGACGCAAGCGCAAGCCCTCTTACCACGAAGAC
TTAACGGAAATGTTGGGAGTTCCTGATTTTCCCGGTTTCGATAACCGGAACGGACGGTCTCGAGACGTCGTCGTTTGGTGAGGTGAAACACGTCGCTGA
AAGTGAGTTTATCGAGACGTTGCATGATTATTACACGGTGGGAGTTACGACCCGTGAGAAGGATGTTTACGTACCGGATCATGGGTTTGTGCAAGATGG
TTCGGCTCCGAGGCTGGACTACGGGAAGTTTACGCATCAAAAACCTTCTACGAAAGGA

>RapsJörg_I50: SEQ. ID. No. 18

TCCTTCACTTCTTTTACCAGTATAACCCCTTACGATGCACAATCCGGAAACATAGTCTGGGGACATTCTACATCAACTGATCTTATCAACTGGACACCTCA
GCCCGCGGCACTACTCCGATCAGAGCCTTATGATTTAAAGGCTGTTTTTTCAGGTTCTACAACAATTTCTCCGGCGGAAAACCGGCAATTTCTTATACC
GGAGTAGATTCTCCGATATCCAAGTTCAAATCTAGCCGTGCCCAAAAATTTATTGGACCCCTTACCTTATAGAATGGGTAATCACCCTTATAATCCAC
TAATAACACCTAATTCAGTGAATAAAATGATGGTCAAATTTTCAGAGACCCGACTACTGCTTGGGTAATCCTACAGATGGTAATGGAGAAATGGTAGT
TGGAAAATAAAAAAATAACACAGGAATGGTATTATGTACAAAAGCAAGAATTTATTGATTGGATTCAAACCTGAACACCTTTGCATTTTAAACAAAT
TCTGGAATGTGGGAATGTCCTGATTTTCCCGGTTTCAACAATTAGTCAAAATGGGTTAGACACTTCGATTTAGGGTCCAAATGTAACAAATGTAATCA
AAGTAAGTGTAGCAAATTTCTGATTACTATACAATTGAATATATAATCAAATAAGGATATCTTTGTCGGGATAATGAATCCTTGGATATTGGATTAGG
ATTTAGATATGATTATGAAAGTATTACGCATCAAAAACCTTCTTGAAGGAA

Fig. 13/3

>RapsJörg_J70: SEQ. ID. No. 19
 TCCTTCACCTGTTTTATCAGTATAACCCCTACGATGCACAATCCGGAAACATAGTCTGGGGACATTCTACATCAACTGATCTTATCAACTGGACACCTCA
 GCCGCCGGCCTACTCCGATCAGAGCCGTATGATTTTAAAGGCTGTTTTTCAGGTTCTACAACAATCTCTCCGGCGGAAAACCGGCAATTTCTCTATACC
 GGAGTAGACTTCTCCGATATCCAAGTTCAAATCTAGCCGTGCCCAAAAATTTATGGACCCCTACCTTATAGAATGGGTAAAATCACCTTATAATCCAC
 TAATAACACCTAATTCAGTGAATAAAATTTGATGGTCAAATTTTCAGAGACCAACTACTGCTTGGGTAAAATCCTACAGATGGTAATTTGGAGAATGGTAGT
 TGGAAATAAAAAAAATAACACAGGAATTTGGTTTATTGTACAAAAGCAAGAATTTTATTGATTGGATTCAAACCTGAACAACCTTTGCATTTTTTAAACAAT
 TCTGGAATGTGGGAATGTCTGATTTTTTCCAGTTTCAACAATTAGTCAAATTTGGTTTAGACACTTCAATTTATGGGTCCAAATGTAACAATGTATTCA
 AAGTAAGTGTAGCAAAATTTCTGATTACTATACAATTTGGAATATATAATCCAATAAGGATATTTTTGTCCCGGATAATGAATCCTTGGATATTGGATTAG
 AT

>RapsJörg_Q48: SEQ. ID. No. 20
 TCCTTCACCTGTTTTATCAGTACAACCCCTACGATGCACAATCCGGAAACATAGTCTGGGGACATTCTACATCAACTGATCTTATCAACTGGACACCTCA
 GCCGCCGGCCTACTCCGATCAGAGCCCTTATGATTTTAAAGGCTGTTTTTCAGGTTCTACAACAATCTCTCCGGCGGAAAACCGGCAATTTCTCTATACC
 GGAGTAGACTTCTCCGATATCCAAGTTCAAATCTAGCCGTGCCCAAAAATTTATGGACCCCTACCTTATAGAATGGGTAAAATCACCTTATAATCCAC
 TAATAACACCTAATTCAGTGAATAAAATTTGATGGTCAAATTTTCAGAGACCAACTACTGCTTGGGTAAAATCCTACAGATGGTAATTTGGAGAATGGTAGT
 TGGAAATAAAAAAAATAACACAGGAATTTGGTTTATTGTACAAAAGCAAGAATTTTATTGATTGGATTCAAACCTGAACAACCTTTGCATTTTTTAAACAAT
 TCTGGAATGTGGGAATGTCTGATTTTTTCCAGTTTCAACAATTAGTCAAATTTGGTTTAGACACTTCAATTTATGGGTCCAAATGTAACAATGTATTCA
 AAGTAAGTGTAGCAAAATTTCTGATTACTATACAATTTGGAATATATAATCCAATAAGGATATTTTTGTCCCGGATAATGAATCCTTGGATATTGGATTAG
 ATTTAGATATGATTATGGAAGTATTACGCTACCAAACCTTTCTACGAAAGGA

>RapsJörg_R3: SEQ. ID. No. 21
 TCCTTCACCTTTTTCTATCAGTACAACCCCTACGATGCACAATCCGGAAACATAGTCTGGGGACATTCTACATCAACTGATCTTATCAACTGGACACCTCA
 GCCGCCGGCCTACTCCGATCAGAGCCCTTATGATTTTAAAGGCTGTTTTTCAGGTTCTACAACAATCTCTCCGGCGGAAAACCGGCAATTTCTCTATACC
 GAGTAGACTTCTCCGATATCCAAGTTCAAATCTAGCCGTGCCCAAAAATTTATGGACCCCTACCTTATAGAATGGGTAAAATCACCTTATAATCCAC
 AATAACACCTAATTCAGTGAATAAAATTTGATGGTCAAATTTTCAGAGACCAACTACTGCTTGGGTAAAATCCTACAGATGGTAATTTGGAGAATGGTAGT
 GGAATAAAAAAAATAACACAGGAATTTGGTTTATTGTACAAAAGCAAGAATTTTATTGATTGGATTCAAACCTGAACAACCTTTGCATTTTTTAAACAAT
 CTGGAATGTGGGAATGTCTGATTTTTTCCAGTTTCAACAATTAGTCAAATTTGGTTTAGACACTTCAATTTATGGGTCCAAATGTAACAATGTATTCA
 AAGTAAGTGTAGCAAAATTTCTGATTACTATACAATTTGGAATATATAATCCAATAAGGATATTTTTGTCCCGGATAATGAATCCTTGGATATTGGATTAG
 ATTTAGATATGATTATGGAAGTATTACGCTACCAAACCTTTCTACGAAAGGA

>RapsJörg_T80: SEQ. ID. No. 22
 TCCTTCACCTGTTTTATCAGTACAACCCCTACGATGCACAATCCGGAAACATAGTCTGGGGACATTCTACATCAACTGATCTTATCAACTGGACACCTCA
 GCCGCCGGCCTACTCCGATCAGAGCCCTTATGATTTTAAAGGCTGTTTTTCAGGTTCTACAACAATCTCTCCGGCGGAAAACCGGCAATTTCTCTATACC
 GGAGTAGACTTCTCCGATATCCAAGTTCAAATCTAGCCGTGCCCAAAAATTTATGGACCCCTACCTTATAGAATGGGTAAAATCACCTTATAATCCAC
 TAATAACACCTAATTCAGTGAATAAAATTTGATGGTCAAATTTTCAGAGACCAACTACTGCTTGGGTAAAATCCTACAGATGGTAATTTGGAGAATGGTAGT
 TGGAAATAAAAAAAATAACACAGGAATTTGGTTTATTGTACAAAAGCAAGAATTTTATTGATTGGATTCAAACCTGAACAACCTTTGCATTTTTTAAACAAT
 TCTGGAATGTGGGAATGTCTGATTTTTTCCAGTTTCAACAATTAGTCAAATTTGGTTTAGACACTTCAATTTATGGGTCCAAATGTAACAATGTATTCA
 AAGTAAGTGTAGCAAAATTTCTGATTACTATACAATTTGGAATATATAATCCAATAAGGATATTTTTGTCCCGGATAATGAATCCTTGGATATTGGATTAG
 ATTTAGATATGATTATGGAAGTATTACGCTACCAAACCTTTCTACGAAAGGA

Vacuolar Invertases

>RapsRT35: SEQ. ID. No. 23
 GATCCCTCGACTGCATGGAAGACATCAGCCGGAAAATGGCGGATCACTATTGGTTTCCAAAATCAACAGAACCGGGATCTCACTCGTGTACGACACGACTG
 ACTTCAAGACTTACGAGAACTCGACACATTGTTGCACAAGTTCCAACACCGGGATGTGGGAGTGTGTTGACTTTTATCCAGTGTCTAAGACCTTGGT
 TAAGGGCTCGACACATCGGTCAATGGACCAGATGTGAAGCAGCTCGTGAAGGCTAGATGGACGACACCAGAAATCGACCATTATGCCATAGGAACATAT
 TTCGATTCGAACCGGGACGTGGATCCCGGATGATCCTACTATTGATGTTGGGATTAGTACTAGTTTAAGATATGATTGCGGAAAGTTTTATGCCTCCAAGT
 CCTTTTACGA

>RapsRT39: SEQ. ID. No. 24
 GACCCATCGACGGCCTGGAAGACATCAGATGGAATAATGGCGGATCACAATCGGTTCCAAGATCAACAAAACCGGGATCTCACTAGTGTACGACACAATCG
 ACTTCAAGACTTACGAGAAACACGACACATTGTTGCACAAGTTCCAACACCGGGATGTGGGAGTGTGTTGACTTCTATCCAGTGTCTAAGACCGCGAT
 CAATGGGCTCGACACATCAGTCAACGGACAAATGTGAAGCAGCTCGTGAAGGCTAGATGGACGACACCAGGTTTGTATTTATGCCGTGGGGACGTAC
 TTTGATTCGAACCGGAACATGGATCCCGGATGATCCTACTATTGATGTTGGGATGAGTGTAGTTTGGATATGATTACGGAAAGTTCTATGCCTCAAAGT
 CATTCTATGAATGGTAECTACTATGCGTGAAGTCATTTTACGA

>RapsJörg_D20: SEQ. ID. No. 25
 TCCTTCACCTGTTTTTACAATAATACTCTTACGCTCCAGAGTTTCAAGATGAGTGAAGAATCATATGGGGCCACTCTGTTTTACAAGACATGGTCAACTGGATCCAA
 CTCGCCCGCAGCACTTTCTCCCTCTGAGTCTACGACATCAACAGCTGCTGGTCAGGATCCGCTACGATCCTCCCGATGGCAAACTGTGATCTTTGTACA
 CCGAATCGATAAACCAGAGAGACGGGAAGACAGACGGCAAGTCAAGTCTTGCCTGACCTAAGATGCTTCCGACCCCTTTGCTTCGTGATGGATGAA
 GCCAAAGCAAAACCTGTCTATGGATCCATCAGAGGACATCCTTCACTACTGTTTCCGTGACCTACCCTGATGCAAGGTCAGATGGAATGGTAAATGGAGA
 GTTCTCATAGGAGCTAAGGAGAGAGATACCTAAGAGGAGTAGCTCTTTTGTACCATAGTACTGATGATTGTGAGCAATGGACTAGGTATCAAGAACCTT
 TACTTGTAGCACAAGCAACGAAATGTTGGAGTGCCTGACTTTTTCCCGTTAAGCTCATGGGTAAAGAAGGTGTAGTACTTCCGTTGAACAATGCTAG
 TGTGAGGCATGTTGAAAGTTAGTTTGGAGGAAGAACTTGGAGGCAAGATTTGTTATGTTATTGGCTCATATGTTCCGAGACTGATAGATTTGTCGGC
 GACTCAGAGCTCACTTACACACGCTGCTGATCTGAGATATGATGATGGATGGTTTTACGCTACCAAACCTTTCTATGAAAGGA

Fig. 13/4

>RapsJörg_E6: SEQ. ID. No. 26

TCCTTCACTTTTCTATCAATATAACCCAAATGCAGCCGTGTGGGGTGACATTGTTGGGGTCACGCTGTCTAAAGATCTTATCCATTGGCTTCACCT
 CCCGTTTGCAATGGTTCCTGACCAATGGTACGACGCTAACGGTGTGGACCGGTTCCGCTACTTTCCTCGATGATGGTCTATTGTGATGCTCTACACT
 GGATCCACCAGCAAAATTCGTACAAGTATTACTTTTAAAACCATTTCTCTGTAAATAAGTATTTGATTCATAATCTTTTGATATGATATCAATAACTC
 TTTTGATATACTGGTGACAGATTTATATAAAACCTTAATTAATCCTTTAAAATCATTTCAAATAAAGATTTATCGGACCAATTAGCGATAATAATATTA
 GCTATTATTATGTTTTAGGTTCAAACCTTGCCCTATCCTGAGGACCCCAATGATCCACTTTTGTGAAATGGACCAAGTCTCTGGCAACCCGGTCTC
 CGAACCGCTCCAGGTATCGGTGATAAGGACTTCCGTGACCCAACAACCTGCGTGAAGACATCAGACGGAAAATGGCGGATCACTATCGGCCCAAAATC
 AATAGAACCAGGAATATCCCTTGTATGACACCGTCGATTTCAAGACCTACGAGAAACACGACATCTGTGACCAAGTCCCAAACACAGGAATGTGGG
 AGTGGCTTGACTTTTATCCGGTGTCAAAGACTAAGCACCACGGTCTTGACACTTCAGTTAATGGACCGGATGTAGGCATATAGTGAAAGCTAGCATGGA
 CGATAACAAGATTCACCATTTGCCATTGGGACGTACTATGATTCTAATGGAACATGGGTCCCGGATAATCCTTCAATTGATGTTGGGATTAGTACCGGT
 TTGAGATACGATTACGGTAAATTTACGCAACAAAACTTTCTACGAAAGGA

>RapsJörg_K28: SEQ. ID. No. 27

TCCTTCACTTATTCATCAATATAATCCAAATGCAGCCGTGTGGGGTGACATTGTTGGGGTCACGCTGTATCAAAGGATCTTATCCACTGGCTTTACCT
 CCCATTGGCATGGTTCCTGACCAATGGTACGATGCTAACGGCGTGGACCGGTTCCGCTACTTTCCTTGATGATGGTCTATTGTGATGCTCTACACT
 GGTTCCACCAGCAAAATTCGTACAGGTAATGATTTTAAAATCCATTTATGCTTCATTAATCACTTTAGTAATGCTTGTGACAGTATAAAACGTGAATAA
 TTGTTTCATAATTAATATTGATTCGAATCTTGTGTTAATGTTGTTATTTACTACGCTTTTAGGTTCAAACCTTGCCATTCCTGAAGACCCAAAAGATC
 CACTTTTGTGAAATGGACCAAGTCTCCGGCAACCCGGTCTTTGACCACTCCAGGTATCGGTGCTAAGGACTTCCGTGACCCAACAACCTGCATGGAA
 GACTTCAGACGGGAAATGGCGGATCACTATTGGCTCCAAATCAACAGAACCGGAATATCTCTTATTACGATACAACAGATTTCAAGACCTACGAGAAA
 CATGAGACCTTGTGACCAAGTCCCAAACACTGGAGTGGGAGTGTGTTGACTTTTATCCAGTGTCCAAGACTAAAGACAAGGGTCTTGACACTTCGGTC
 AATGGACCGGATGTTAAGC

>RapsJörg_O42: SEQ. ID. No. 28

TCCTTCACTTGTTTTACCAGTACAATCCAAATGGAGCCGTGTGGGGTGACATTGTTGGGGTCACGCTGTATCAAAGGATCTTATCCACTGGCTTTACCT
 CCCATTGGCATGGTTCCTGACCAATGGTACGATGCTAACGGCGTGGACCGGTTCCGCTACTTTCCTTGATGATGGTCTATTGTGATGCTCTACACT
 GGTTCCACCAGCAAAATTTGTACAAGTAATGATTTTAAAATCCATTTGTTGCTTAACCAACTCTATTAATGCTTGTGACAGTATGGAATGTAATAA
 ATGTTTCATAAATGTAATAGTATGATTCGAATCTTGTGTTGGTAGCATAAAATATATTTCAATATAAATGTTTAAAGCAATTAGCGACAATATGTTGTTT
 ACTACGCTTTTAGGTTCAAACCTTGCCCTATCCTGAAGACCCAAAGATCCACTTTTGTGAAATGGACCAAGTCTCCGGCAACCCGGTCTTGTACCA
 CTTCCAGGTAATCGGTGATAAGGACTTCCGTGACCCAACAACCTGCATGGAAGACATCAGACGGGAAATGGCGGATCACTATTGGCTCCAAAATCAACAGAA
 CCGGAATATCTCTTATTTACGATACAACAGATTTCAAGACCTACGAGAAGCATGAGACCTTGTGACCAAGTCCCAAACACTGGAAATGTGGGAGTGGCT
 TGACTTTTATCCAGTGTCCAGACTAAAGACAAGGGTCTTGACACTTCCGGTCAATGGACCGGATGTTAAGCATATCATTAAGGCTAGCATGGACGATAC
 AGAATTGACCATATGCCATTGGGACATACTATGACTCTAATGCAACATGGGTCCCGGATAATCCTTCAATCGATGTCGGGATTAGTACCGGTTTGAGAT
 ATGATTACGGTAAATTTTACGCAACCAAGACCTTCTCGAAAGGA

>RapsJörg_N39: SEQ. ID. No. 29

TCCTTCACTTGTTTTATCAATATAACCCAAATGCAGCCGTGTGGGGTGACATTGTTGGGGTCACGCTGTATCAAAGGATCTTATCCACTGGCTTCACCTCC
 CGTTTGCAATGGTTCCTGACCAATGGTACGACGCTAACGGTGTGGACCGGTTCCGCTACTTTCCTCGATGATGGTCTATTGTGATGCTCTACACTGG
 ATCCACCGACAATTCGTACAAGTATTACTTTTAAAACCATTTCTCTGTAAATAAGTATTTGATTCATAATGCTTTTGATATGATATCAATAAATCTTT
 TGATATACTGGTGACAGATTTATATAAAACGTAATTAATCTTTATAAATCGTTTCATAAAGATTTTATCGGACCAATTAACGATAAATAATATTAGTA
 TTATTATGTTTTTAGTTCAAAACCTTGCCCTATCCTGAGGACCCAAATGATCCACTTTTGTGAAATGGACCAAGTCTCTGGCAACCCGGTCTCGAAC
 CGCCTCCAGGTATCGGTGATAAGGACTTCCGTGACCCAACAACCTGCGTGAAGACATCAGACGGAAAATGGCGGATCACTATCCGTCTCCAAAATCAATA
 GAACCGGAATATCCCTGTTTATGACACAGTTCGATTTCAAGACCTACGAGAACACGATATCTTGTGACCAAGTCCCAAACACTGGAAATGTGGGAGTG
 CGTTGACTTTTATCCGGTGTCAAAGACTAAGCACCACGGTCTTGACACTTCAGTTAATGGACCGGATGTTAGGCATATAGTGAAAGCTAGCATGGACGAT
 ACAAGAAATGACCATTTGCCATTGGGACCTACTATGATTCTAATGGAACATGGGTCCCGGATAATCCTTCAATTGATGTCGGGATTAGTACCGGTTTGA
 GATACGATTACGGTAAATTTTACGCATCCAAAACCTTCTACGAAAGGA

>RapsJörg_M12: SEQ. ID. No. 30

TCCTTCACTGTTTTTATCAGTACAACCCAAATGCAGCCGTGTGGGGTGACATTGTTGGGGTCACGCTGTATCAAAGGATCTTATCCACTGGCTTTACCT
 CCCATTGGCATGGTTCCTGACCAATGGTACGATGCTAACGGCGTGGACCGGTTCCGCTACTTTCCTCGATGATGGTCTATTGTGATGCTCTACACTGG
 GGTCCACCAGCAAAATTCGTACAGGTAATGATTTTAAAATCCATTTATTGCTTCATTAATCACTTTAGTAATGCTTGTGACAGTATAAAAACGTGAATAA
 TTGTTTCATAAATTAATATTGATTCCAATCTTGTGTTAATGTTGTTATTTTACTACGCTTTTAGGTTCAAACCTTGCCCTATCCTGAAGACCCAAAAGATC
 CACTTTTGTGAAATGGACCAAGTCTCCGGCAACCCGGTCTTGTGACCACTCCAGGTATCGGTGCTAAGGACTTCCGTGACCCAACAACCTGCATGGAA
 GACTTCAGACGGGAAATGGCGGATCACTATTGGCTCCAAAATCAACAGAACCGGAATATCTCTTATTACGATACAACAGATTTCAAGACCTACGAGAAA
 CATGAGACCTTGTGACCAAGTCCCAAACACTGGAAATGTGGGAGTGTGTTGACTTTTATCCAGTGTCCAAGACTAAGACCAAGGGCTTGAACATTCGG
 TCAATGGACCGGATGTTAAGCATATCATTAGGCTAGCATGGACGATACGATGACACTTCAGTTAATGGACCGGATGTTAGGCATATAGTGAAAGCTAGCATGGACGAT
 GGTCCCGACAATCCTTCAATCGATGTCGGGATTAGTACCGGTTTGAGATATGATTACGGTAAATTTTACGCTCCAAGACCTTCTTTGAAAGGA

>S10: SEQ. ID. No. 31

TCCTTCACTTTTCTACCAGTATAACCCAAATGCAGCCGTGTGGGGTGACATTGTTGGGGTCACGCTGTATCAAAGGATCTTATCCACTGGCTTCACCT
 CCCGTTTGCAATGGTTCCTGACCAATGGTACGACGCTAACGGTGTGGACCGGTTCCGCTACTTTCCTCGATGATGGTCTATTGTGATGCTCTACACT
 GGATCCACCAGCAAAATTCGTACAAGTATTACTTTTAAAACCATTTCTCTGTAAATAAGTATTTGATTCATAATCTTTTGATATGATATCAATAACTC
 TTTTGATATACTGGTGACAGATTTATATAAACTTAATTAATCTTTAAAATCATTTCAAATAAAGATTTATCGGACCAATTAACGATAAATAATATTA
 GCTATTATTATGTTTTAGGTTCAAACCTTGCCCTATCCTGAGGACCCCAATGATCCACTTTTGTGAAATGGACCAAGTCTCTGGCAACCCGGTCTC
 GAACCGCTCCAGGTATCGGTGATAAGGACTTCCGTGACCCAACAACCTGCGTGAAGACATCAGACGGAAAATGGCGGATCACTATCCGTCCAAAATCA
 ATAGAACCAGGAATATCCCTTGTATGACACCGTCGATTTCAAGACCTACGAGAACACGACATCTTGTGACCAAGTCCCAAACACAGGAATGTGGGA
 GTGCGTTGACTTTTATCCGGTGTCAAAGACTAAGCACCACGGTCTTGACACTTCAGTTAATGGACCGGATGTTAGGCATATAGTGAAAGCTAGCATGGAC
 GATACAAGAAATGACCATTTGCCATTGGGACGTACTATGATTCTAATGGAACGTTGGTCCCGGATAATCCTTCAATTGATGTTGGGATTAGTACCGGTT
 TGAGATACGATTACGGTAAATTTTACGCATCAAAAACCA

Fig. 13/5

>RapsJörg_RTA4: SEQ. ID. No. 32

TCCTTCACTTTTTTATCAGTACAACCCGTGATTCAGCTATTTGGGAAATATCACATGGGGCCATGCAATATCCACGGACTTGATCCATTGGCTTTACTT
 GCCCTTCGCCTTGGTTCCCTGATCAATGGTACGATATCAACGGTGTCTGGACCGGGTCCGCGACCTTCTACCCGACGGTCAGATCATGATGTTATACACC
 GGTGATACCAATGATTACGTGCAGGTGCAAAATCTTGCCTACCCGCCAACTTATCGGATCCCCTCCTCATCGACTGGGTCAAGTACCGGGGCAACCCGG
 TCATGGTTCCACCACCCGGCATTGGTGTCAAGGACTTTAGAGACCCAAACGACTGCTTGGACCGGACCACAAAACGGGCAGTGGCTGCTTACCATCGGGT
 CAAGATTGGTAAAACGGGTATTGCAATGTTTATGGTACTTCCAACCTCACAACTTTAAGCTATTGGATGGAGTTTTCATGCGGTTCCGGGTACGGGT
 ATGTGGGAGTGTGTGGACTTTTACCCGGTATCAACCGATGAGGCAAAACGGGTGGACACATCATATAACGGGCCAGGTATAAAGCATGTGTTAAAAGCAA
 GTTTAGATGACGATAAGCATGATTACTATGCTATTGGGACATATGACCCGGTAAAGAACAATGGACTCCTGATAACCCGCAATTGGATGTGGGTATCGG
 GTTGAGACTA

>RapsJörg_RTC46: SEQ. ID. No. 33

TCCTTCACTTGTTTTTATCAGTACAACCCGTGATTCAGCTATTTGGGAAATATCACATGGGGCCATGCAATATCCACGGACTTGATCCATTGGCTTTACTT
 GCCCTTCGCCTTGGTTCCCTGATCAATGGTACGATATCAACGGTGTCTGGACCGGGTCCGCGACCTTCTACCCGACGGTCAGATCATGATGTTATACACC
 GGTGATACCAATGATTACGTGCAGGTGCAAAATCTTGCCTACCCGCCAACTTATCGGATCCCCTCCTCATCGACTGGGTCAAGTACCGGGGCAACCCGG
 TCATGGTTCCACCACCCGGCATTGGTGTCAAGGACTTTAGAGACCCAAACGACTGCTTGGACCGGACCACAAAACGGGCAGTGGCTGCTTACCATCGGGT
 CAAGATTGGTAAAACGGGTATTGCAATGTTTATGGTACTTCCAACCTCACAACTTTAAGCTATTGGATGGAGTTTTCATGCGGTTCCGGGTACGGGT
 ATGTGGGAGTGTGTGGACTTTTACCCGGTATCAACCGATGAGGCAAAACGGGTGGACACATCATATAACGGGCCAGGTATAAAGCATGTGTTAAAAGCAA
 GTTTAGATGACGATAAGCATGATTACTATGCTATTGGGACATATGACCCGGTAAAGAACAATGGACTCCTGATAACCCGCAATTGGATGTGGGTATCGG
 GTTGAGACTGGACTACGGGAAATACTACGCAACCAAACTTCTTCGAAAGGA

>RapsJörg_RTD75: SEQ. ID. No. 34

TCCTTCACTTGTTTTTACAGTATAACCCGTGATTCAGCTATTTGGGAAATATCACATGGGGCCATGCAATATCCACGGACTTGATCCATTGGCTTTACTT
 GCCCTTCGCCTTGGTTCCCTGATCAATGGTACGATATCAACGGTGTCTGGACCGGGTCCGCGACCTTCTACCCGACGGTCAGATCATGATGTTATACACC
 GGTGATACCAATGATTACGTGCAGGTGCAAAATCTTGCCTACCCGCCAACTTATCGGATCCCCTCCTCATCGACTGGGTCAAGTACCGGGGCAACCCGG
 TCATGGTTCCACCACCCGGCATTGGTGTCAAGGACTTTAGAGACCCAAACGACTGCTTGGACCGGACCACAAAACGGGCAGTGGCTGCTTACCATCGGGT
 CAAGATTGGTAAAACGGGTATTGCAATGTTTATGGTACTTCCAACCTCACAACTTTAAGCTATTGGATGGAGTTTTCATGCGGTTCCGGGTACGGGT
 ATGTGGGAGTGTGTGGACTTTTACCCGGTATCAACCGATGAGGCAAAACGGGTGGACACATCATATAACGGGCCAGGTATAAAGCATGTGTTAAAAGCAA
 GTTTAGATGACGATAAGCATGATTACTATGCTATTGGGACATATGACCCGGTAAAGAACAATGGACTCCTGATAACCCGCAATTGGATGTGGGTATCGG
 GTTGAGACTGGACTACGGGAAATACTACGCAACCAAACTTCTTCGAAAGGA

>RapsJörg_RTE72: SEQ. ID. No. 35

TCCTTCACTTGTTCATCAGTATAACCCGTGATTCAGCTATTTGGGAAATATCACATGGGGCCATGCAATATCCACGGACTTGATCCATTGGCTTTACTT
 GCCCTTCGCCTTGGTTCCCTGATCAATGGTACGATATCAACGGTGTCTGGACCGGGTCCGCGACCTTCTACCCGACGGTCAGATCATGATGTTATACACC
 GGTGATACCAATGATTACGTGCAGGTGCAAAATCTTGCCTACCCGCCAACTTATCGGATCCCCTCCTCATCGACTGGGTCAAGTACCGGGGCAACCCGG
 TCATGGTTCCACCACCCGGCATTGGTGTCAAGGACTTTAGAGACCCAAACGACTGCTTGGACCGGACCACAAAACGGGCAGTGGCTGCTTACCATCGGGT
 CAAGATTGGTAAAACGGGTATTGCAATGTTTATGGTACTTCCAACCTCACAACTTTAAGCTATTGGATGGAGTTTTCATGCGGTTCCGGGTACGGGT
 ATGTGGGAGTGTGTGGACTTTTACCCGGTATCAACCGATGAGGCAAAACGGGTGGACACATCATATAACGGGCCAGGTATAAAGCATGTGTTAAAAGCAA
 GTTTAGATGACGATAAGCATGATTACTATGCTATTGGGACATATGACCCGGTAAAGAACAATGGACTCCTGATAACCCGCAATTGGATGTGGGTATCGG
 GTTGAGACTGGACTACGGGAAATACTACGCTTCCAAAACCTTCTTCGAAAGGA

>RapsJörg_RTF2: SEQ. ID. No. 36

TCCTTCACTTGTTCATCAGTATAACCCGTGATTCAGCTATTTGGGAAATATCACATGGGGCCATGCAATATCCACGGACTTGATCCATTGGCTTTACTT
 GCCCTTCGCCTTGGTTCCCTGATCAATGGTACGATATCAACGGTGTCTGGACCGGGTCCGCGACCTTCTACCCGACGGTCAGATCATGATGTTATACACC
 GGTGATACCAATGATTACGTGCAGGTGCAAAATCTTGCCTACCCGCCAACTTATCGGATCCCCTCCTCATCGACTGGGTCAAGTACCGGGGCAACCCGG
 TCATGGTTCCACCACCCGGCATTGGTGTCAAGGACTTTAGAGACCCAAACGACTGCTTGGACCGGACCACAAAACGGGCAGTGGCTGCTTACCATCGGGT
 CAAGATTGGTAAAACGGGTATTGCAATGTTTATGGTACTTCCAACCTCACAACTTTAAGCTATTGGATGGAGTTTTCATGCGGTTCCGGGTACGGGT
 ATGTGGGAGTGTGTGGACTTTTACCCGGTATCAACCGATGAGGCAAAACGGGTGGACACATCATATAACGGGCCAGGTATAAAGCATGTGTTAAAAGCAA
 GTTTAGATGACGATAAGCATGATTACTATGCTATTGGGACATATGACCCGGTAAAGAACAATGGACTCCTGATAACCCGCAATTGGATGTGGGTATCGG
 GTTGAGACTGGACTACGGGAAATACTACGCTTCCAAAACCTTCTTCGAAAGGA

Fig. 14

Expression of rapeseed invertases:

| Organs | From genomic DNA (G) or from RNA (R) | Plasmid | Leaf | Stem | Root | Small flower bud | Big flower bud | Flower | Anthers | Pistil | Siliques young |
|-------------------------|--------------------------------------|----------|------|------|------|------------------|----------------|--------|---------|--------|----------------|
| Invertase-Clones | | | | | | | | | | | |
| Inv-Cellwall: | | | | | | | | | | | |
| Inv 2 (B69) | G | pJHB1-69 | - | - | - | - | ++ | ++ | ++++ | + | - |
| Inv 4 | | | - | - | - | - | ++ | ++ | ++ | + | - |
| Inv 3 (A1) | G | pJHB1-1 | + | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | +++ | +++ |
| Inv-Vacuolar: | | | | | | | | | | | |
| RT 35 | | | + | + | -/+ | + | ++ | ++ | +++ | ++ | + |
| E 6 | G | pJHB1-6 | + | -/+ | +++ | -/+ | +++ | +++ | +++ | ++ | + |

? = not investigated; - = no expression; + = slight expression; ++ = moderate expression; +++ = strong expression; ++++ = very strong expression

Fig. 15

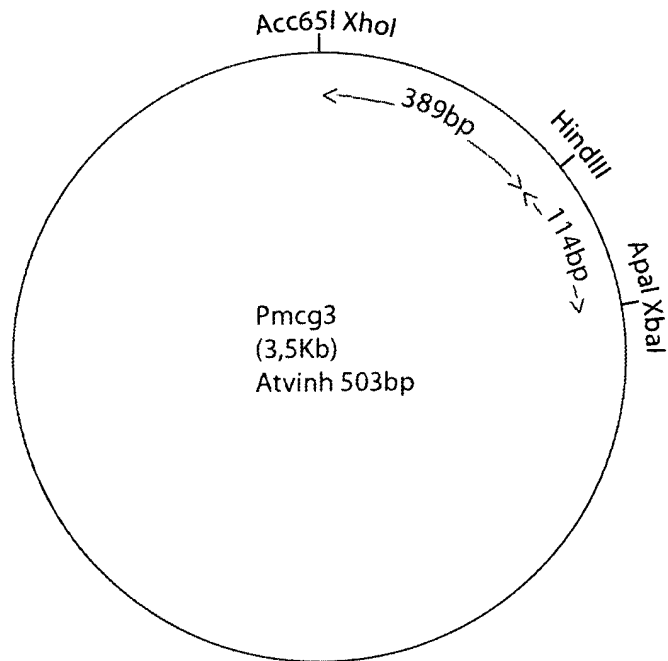
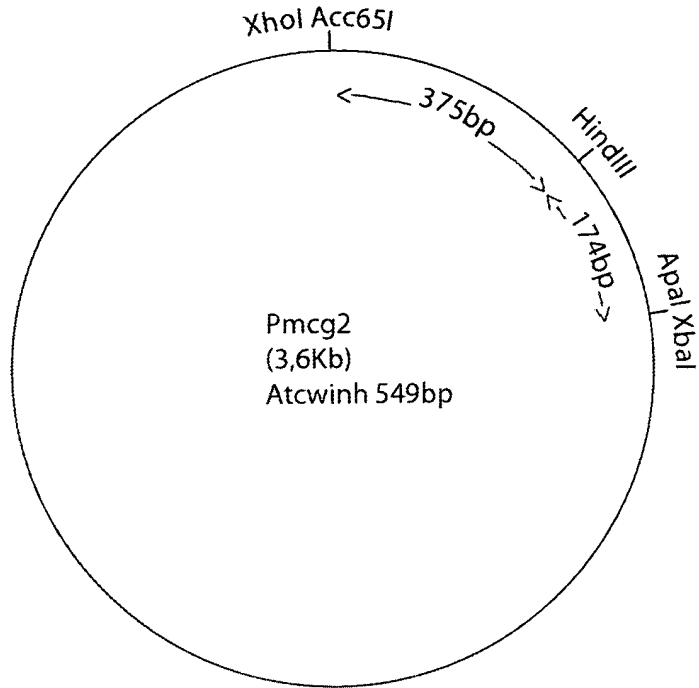


Fig. 16

| | | | |
|---|--|---|--|
| Plasmid name: <i>pmcg2-4^{12,15}</i> | | Plasmid Data Sheet No.: <i>K03-4</i> | |
| Description: <i>Arabidopsis thaliana cell-wall active site inhibitor cDNA</i> | | | |
| Selection marker(s) | | Size (bp): | Host strain(s): |
| Prokaryotic: <i>Ampicilin</i> | Eukaryotic: | <i>3'6 Kb</i> | <i>E. coli (DH5α)</i> |
| Insert | Gene name: <i>Atwim1</i> | Organism: <i>A.t.</i> | <input type="checkbox"/> cDNA <input type="checkbox"/> genomic DNA |
| Source | <input type="checkbox"/> Plasmid - name: <input checked="" type="checkbox"/> RNA - isolated from: <input type="checkbox"/> Genomic DNA - isolated from: <input type="checkbox"/> other: <i>Arabidopsis thaliana leaves from Spain</i> | | |
| Restriction/modifying enzymes used: | | Primers & annealing temper. for RT/PCR: | Size (bp): |
| <i>Acc 65I - XbaI</i> | | <i>Atwim1-1 / Atwim1-2</i> <i>60°C</i> | <i>5490</i> |
| Vector Name: | Type: | Restriction/modifying enzymes used: | Size (bp): |
| <i>pBluescript KS+</i> | <i>cloning</i> | <i>Acc 65I - XbaI</i> | <i>3'040</i> |
| Remarks on cloning strategy and use: | | | |
| <i>Both primers have two restriction sites for subsequent cloning</i> | | | |
| <i>Atwim1-1 (Acc 65I, XbaI) Atwim1-2 (ApaI, XbaI)</i> | | | |
| Path & File(s) with Sequence(s)/Accession No.: | | Path and File with Plasmid MAP: | |
| <i>AgriGenus / Mailer / sequences / Atwim1 sequences</i> | | <i>for cloning</i> | |
| Constructed by: | Time period: | Lab book no./pp.: | Publication: |
| <i>Marcus Garcia</i> | <i>July - July 03</i> | <i>lab book # 1</i> | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Glycerol(s) | | DNA: <input type="checkbox"/> Miniprep / <input checked="" type="checkbox"/> Midiprep | |
| No(s) in Personal Archive: <i>23, 24, 25</i> | | Storage (Box No./Position.): | |
| No(s) in Glycerol Data Base: <i>97, 98, 99</i> | | <i>Marcus - ZPC (cloning)</i> | |
| Storage (Box No./Position): <i>F1</i> | | | |
| Please append on a separate sheet a hand drawn or electronically generated plasmid MAP including key restriction enzyme sites! | | | |

Fig. 17

| | |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| Plasmid name: <i>pmg 3-2,3, 11</i> | Plasmid Data Sheet No.: <i>MG-5</i> |
|------------------------------------|-------------------------------------|

| |
|--|
| Description: <i>Arabidopsis thaliana vesicular vesicles inhibitor in plasmid KS(+)</i> |
|--|

| | | | |
|--------------------------------|-------------|-------------|-----------------------|
| Selection marker(s) | | Size (bp): | Host strain(s): |
| Prokaryotic: <i>Ampicillin</i> | Eukaryotic: | <i>35Kb</i> | <i>E. coli (DH5α)</i> |

| | | | |
|--------|---|-----------------------|--|
| Insert | Gene name: <i>AtJuh</i> | Organism: <i>A.t.</i> | <input type="checkbox"/> cDNA <input type="checkbox"/> genomic DNA |
| Source | <input type="checkbox"/> Plasmid - name: <input checked="" type="checkbox"/> RNA - isolated from: <input type="checkbox"/> Genomic DNA - isolated from: <input type="checkbox"/> other: | | |
| | <i>Arabidopsis thaliana leaves from Vienna</i> | | |

| | | |
|-------------------------------------|---|--------------|
| Restriction/modifying enzymes used: | Primers & annealing temper. for RT/PCR: | Size (bp): |
| <i>Acc65I - XbaI</i> | <i>AtJuh-1 / AtJuh-2 (45°C)</i> | <i>306bp</i> |

| | | | |
|-----------------|----------------|-------------------------------------|-------------|
| Vector Name: | Type: | Restriction/modifying enzymes used: | Size (bp): |
| <i>pB KS(+)</i> | <i>cloning</i> | <i>Acc65I - XbaI</i> | <i>35Kb</i> |

| |
|--|
| Remarks on cloning strategy and use: |
| <i>AtJuh-1 has Acc65I - XbaI sites</i> |
| <i>AtJuh-2 has ApaI - XbaI sites</i> |

| | |
|---|---------------------------------|
| Path & File(s) with Sequence(s)/Accession No.: | Path and File with Plasmid MAP: |
| <i>AgBioTech/MauCNA (sequences/AtJuh sequenced @ the company)</i> | |

| | | | |
|-----------------------|-----------------------|--------------------|--------------|
| Constructed by: | Time period: | Lab book no./pp.: | Publication: |
| <i>MauCNA Gmeiner</i> | <i>July - July 08</i> | <i>lab book 41</i> | |

| | |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Glycerol(s) | DNA: <input type="checkbox"/> Miniprep / <input checked="" type="checkbox"/> Midiprep |
| No(s) in Personal Archive: <i>26, 27, 28</i> | Storage (Box No./Position.): |
| No(s) in Glycerol Data Base: <i>100, 101, 102</i> | <i>MauCNA (-20°C) colony 11</i> |
| Storage (Box No./Position): <i>F1</i> | |

| |
|---|
| <i>Please append on a separate sheet a hand drawn or electronically generated plasmid MAP including key restriction enzyme sites!</i> |
|---|

Fig. 18

| | |
|---|---|
| Plasmid name: pmb1 18, 22, A1, A5 | Plasmid Data Sheet No.: KGS-3 |
|---|---|

Description:
pyk10-promotor (Arabidopsis) + N.t. cell wall invertase inhibitor

| | | | |
|----------------------------|------------------------|-------------------|------------------------|
| Selection marker(s) | | Size (bp): | Host strain(s): |
| Prokaryotic: Ampicillin | Eukaryotic: Hygromycin | 2010 kb | E. coli (DH5α), Agro |

| | | | |
|---------------|--|------------------------|---|
| Insert | Gene name: pyk10 (AJ292756) | Organism: A. T. | <input type="checkbox"/> cDNA <input checked="" type="checkbox"/> genomic DNA |
| Source | <input type="checkbox"/> Plasmid - name: <input type="checkbox"/> RNA - isolated from: <input checked="" type="checkbox"/> Genomic DNA - isolated from: <input type="checkbox"/> other: Arabidopsis thaliana leaves | | |

| | | |
|---|--|-----------------------------|
| Restriction/modifying enzymes used: Acc65I - Acc65I | Primers & annealing temper. for RT/PCR: 1.) Pyk10-FORW; Pyk10-REV; 52°C 2.) Pyk10-C; Pyk10-F2; 48°C | Size (bp): 114 kb |
|---|--|-----------------------------|

| | | | |
|-------------------------------|------------------------|---|------------------------------|
| Vector Name: pTF2-6 | Type: binary | Restriction/modifying enzymes used: Acc65I - Acc65I | Size (bp): 18.6 kb |
|-------------------------------|------------------------|---|------------------------------|

Remarks on cloning strategy and use:
The second pair of primers have on both sides restriction sequences for Acc65I
* The clones of pGAD69, pAS were created by me (me) by E.coli retrotransformation, and RR.

| | |
|--|--|
| Path & File(s) with Sequence(s)/Accession No.: AgriGenus/Kanicut/sequences/pmb1-18 | Path and File with Plasmid MAP: |
|--|--|

| | | | |
|---|--|--|---------------------|
| Constructed by: Mikko Rauter and Kaisa Jantala | Time period: May - July 2003 | Lab book no./pp.: practical course protocol #1/#2 | Publication: |
|---|--|--|---------------------|

| | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> Glycerol(s) | DNA: <input type="checkbox"/> Miniprep / <input checked="" type="checkbox"/> Midiprep |
| No(s). in Personal Archive: 45, 46, 17, 18 | Storage (Box No./Position.): |
| No(s) in Glycerol Data Base: 99, 90, 91, 92 | Kanicut - 2°C |
| Storage (Box No./Position): F1 | |

Please append on a separate sheet a hand drawn or electronically generated plasmid MAP including key restriction enzyme sites!

Fig. 19

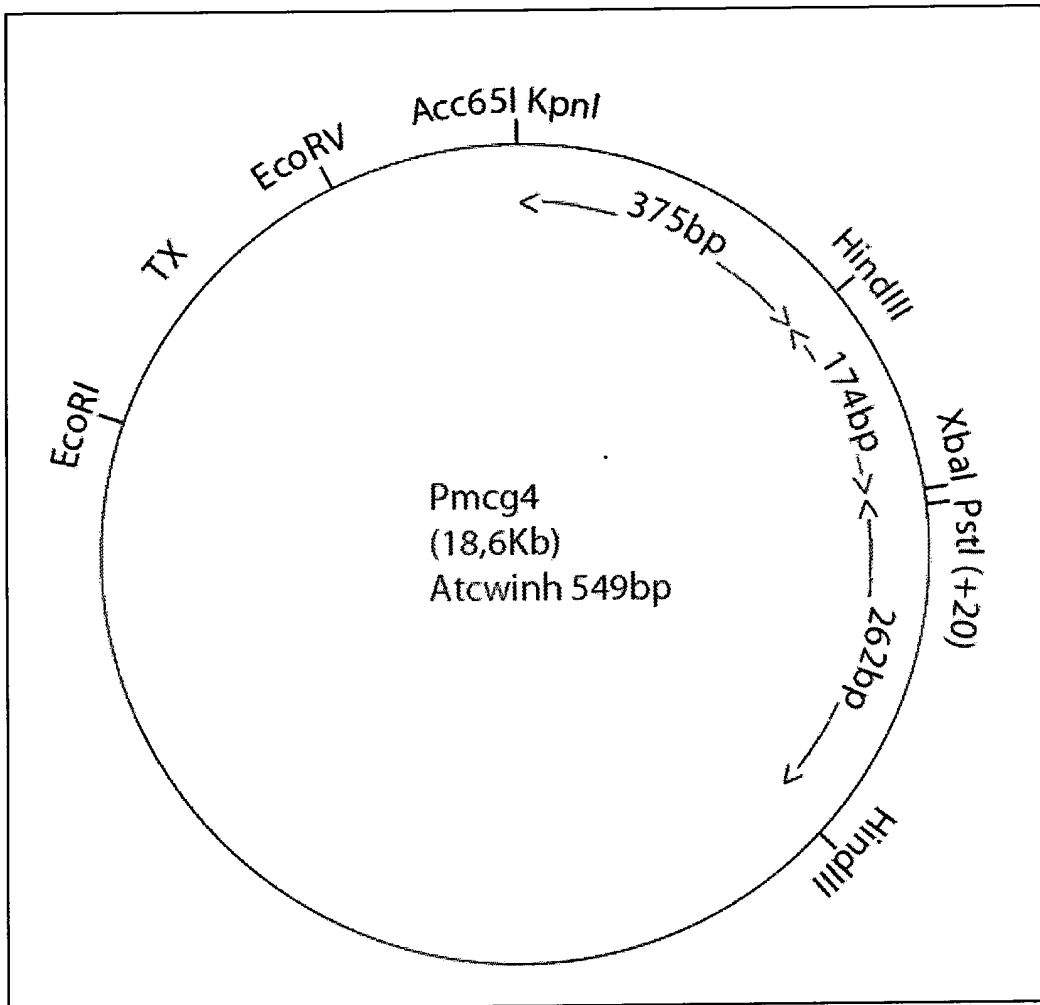


Fig. 20

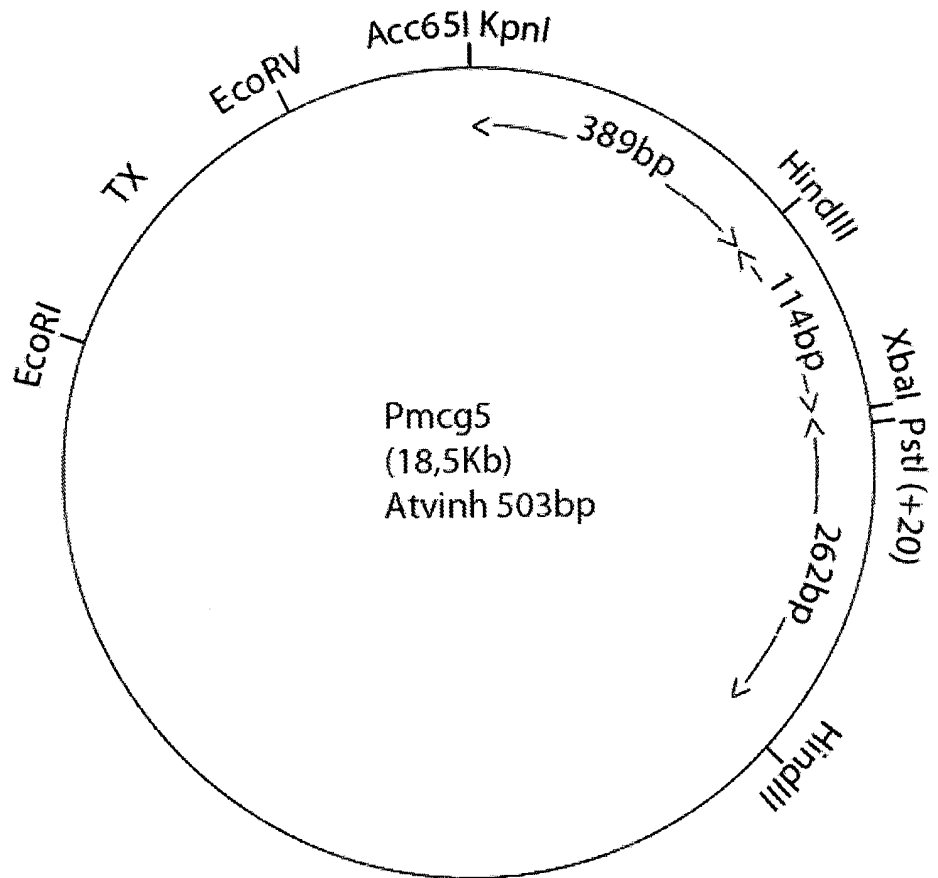


Fig. 21

| | |
|------------------------------|----------------------------------|
| Plasmid name: pmeq 4-1, 5 | Plasmid Data Sheet No.: NC9-6 |
|------------------------------|----------------------------------|

Description:
Bin-Hyg-Tx vector with At. cell wall invertase inhibitor

| | | | |
|-------------------------|------------------------|------------|-----------------|
| Selection marker(s) | | Size (bp): | Host strain(s): |
| Prokaryotic: Ampicillin | Eukaryotic: Hygromycin | 18'55Kb | DUSA |

| | | | |
|--|--|---|---|
| Insert | Gene name: Atwimh | Organism: At | <input checked="" type="checkbox"/> cDNA <input type="checkbox"/> genomic DNA |
| Source | <input checked="" type="checkbox"/> Plasmid - name: pmeq2-4 <input type="checkbox"/> RNA - isolated from: <input type="checkbox"/> Genomic DNA - isolated from: <input type="checkbox"/> other: | | |
| Restriction/modifying enzymes used: Acc65I / XbaI | | Primers & annealing temper. for RT/PCR: | Size (bp): 519 pb |

| | | | |
|-----------------------|-----------------|---|---------------------|
| Vector Name: pM2-6 | Type: binary | Restriction/modifying enzymes used: Acc 65I / XbaI | Size (bp): 18 Kb |
|-----------------------|-----------------|---|---------------------|

Remarks on cloning strategy and use:
The At cellular inhibitor is removed and the resulting plasmid used to clone Atwimh Acc65I - XbaI

| | |
|--|---------------------------------|
| Path & File(s) with Sequence(s)/Accession No.: | Path and File with Plasmid MAP: |
|--|---------------------------------|

| | | | |
|----------------------------------|---------------------------|-------------------|--------------|
| Constructed by: Manick Sankar | Time period: August-03 | Lab book no./pp.: | Publication: |
| | | LAB BOOK #1 | |

| | |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Glycerol(s) | DNA: <input type="checkbox"/> Miniprep / <input checked="" type="checkbox"/> Midiprep |
| No(s) in Personal Archive: 29 80 | Storage (Box No./Position.): 12th 12th outie (4-5) |
| No(s) in Glycerol Data Base: 103, 104 | |
| Storage (Box No./Position): FA | |

Please append on a separate sheet a hand drawn or electronically generated plasmid MAP including key restriction enzyme sites!

Fig. 22

| | |
|------------------------------------|---|
| Plasmid name: <i>pmc5 5-1,3</i> | Plasmid Data Sheet No.: <i>KCS-7</i> |
|------------------------------------|---|

Description:
Bin-xyb-Tx Arabinose inducible

| | | |
|-------------------------------|------------------------------|-----------------|
| Selection marker(s) | Size (bp): | Host strain(s): |
| Prokaryotic: <i>Kanamycin</i> | Eukaryotic: <i>Hygro myc</i> | <i>DH5α</i> |
| | <i>12.5 kb</i> | |

| | | | |
|-------------------------------------|--|-----------------------|--|
| Insert | Gene name: <i>Arabin</i> | Organism: <i>A.t.</i> | <input type="checkbox"/> cDNA <input type="checkbox"/> genomic DNA |
| Source | <input checked="" type="checkbox"/> Plasmid - name: <i>pmc5 3-11</i> <input type="checkbox"/> RNA - isolated from: <input type="checkbox"/> Genomic DNA - isolated from: <input type="checkbox"/> other: | | |
| Restriction/modifying enzymes used: | Primers & annealing temper. for RT/PCR: | Size (bp): | |
| <i>Acc65I - XbaI</i> | | <i>50390</i> | |

| | | | |
|---|------------------------|---|----------------------------|
| Vector Name: <i>Bin-xyb-Tx (pT2-6)</i> | Type: <i>binary</i> | Restriction/modifying enzymes used: <i>Acc65I - XbaI</i> | Size (bp): <i>12 kb</i> |
|---|------------------------|---|----------------------------|

Remarks on cloning strategy and use:

pT2-6 vector is used, Ampicillin is removed by ^{restriction} Acc65I-XbaI sites and Arabin induced here.

| | |
|--|---------------------------------|
| Path & File(s) with Sequence(s)/Accession No.: | Path and File with Plasmid MAP: |
|--|---------------------------------|

| | | | |
|--|-------------------------------|---|--------------|
| Constructed by: <i>Heidi Garcia</i> | Time period: <i>Aug 03</i> | Lab book no./pp.: <i>LAB BOOK #1</i> | Publication: |
|--|-------------------------------|---|--------------|

| | |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Glycerol(s) | DNA: <input type="checkbox"/> Miniprep / <input checked="" type="checkbox"/> Midiprep |
| No(s) in Personal Archive: <u><i>31, 32</i></u> | Storage (Box No./Position): <i>Mid 12ml tube pmc5-3</i> |
| No(s) in Glycerol Data Base: <u><i>105, 106</i></u> | |
| Storage (Box No./Position): <u><i>F1</i></u> | |

Please append on a separate sheet a hand drawn or electronically generated plasmid MAP including key restriction enzyme sites!

Fig. 23

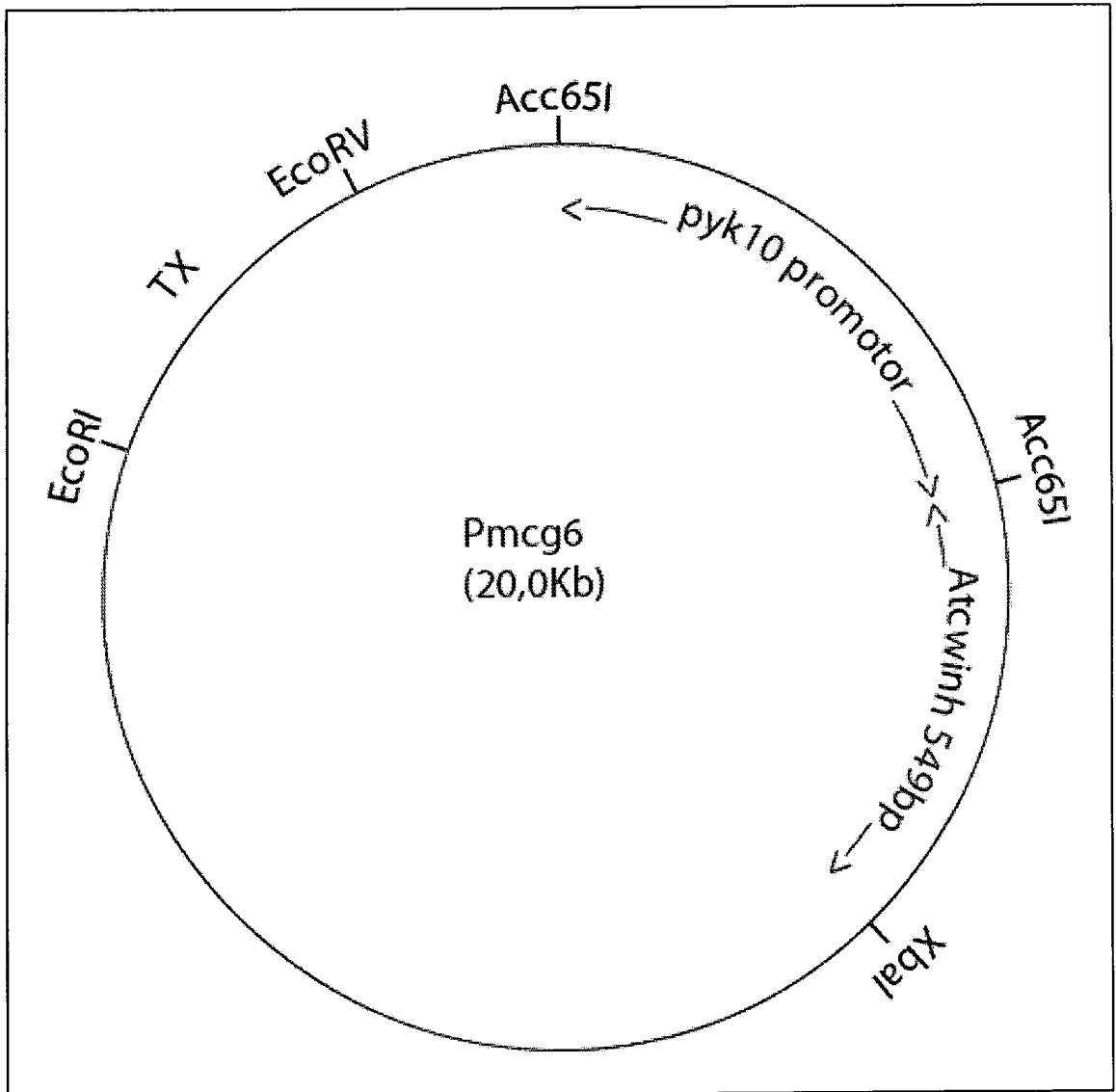


Fig. 24

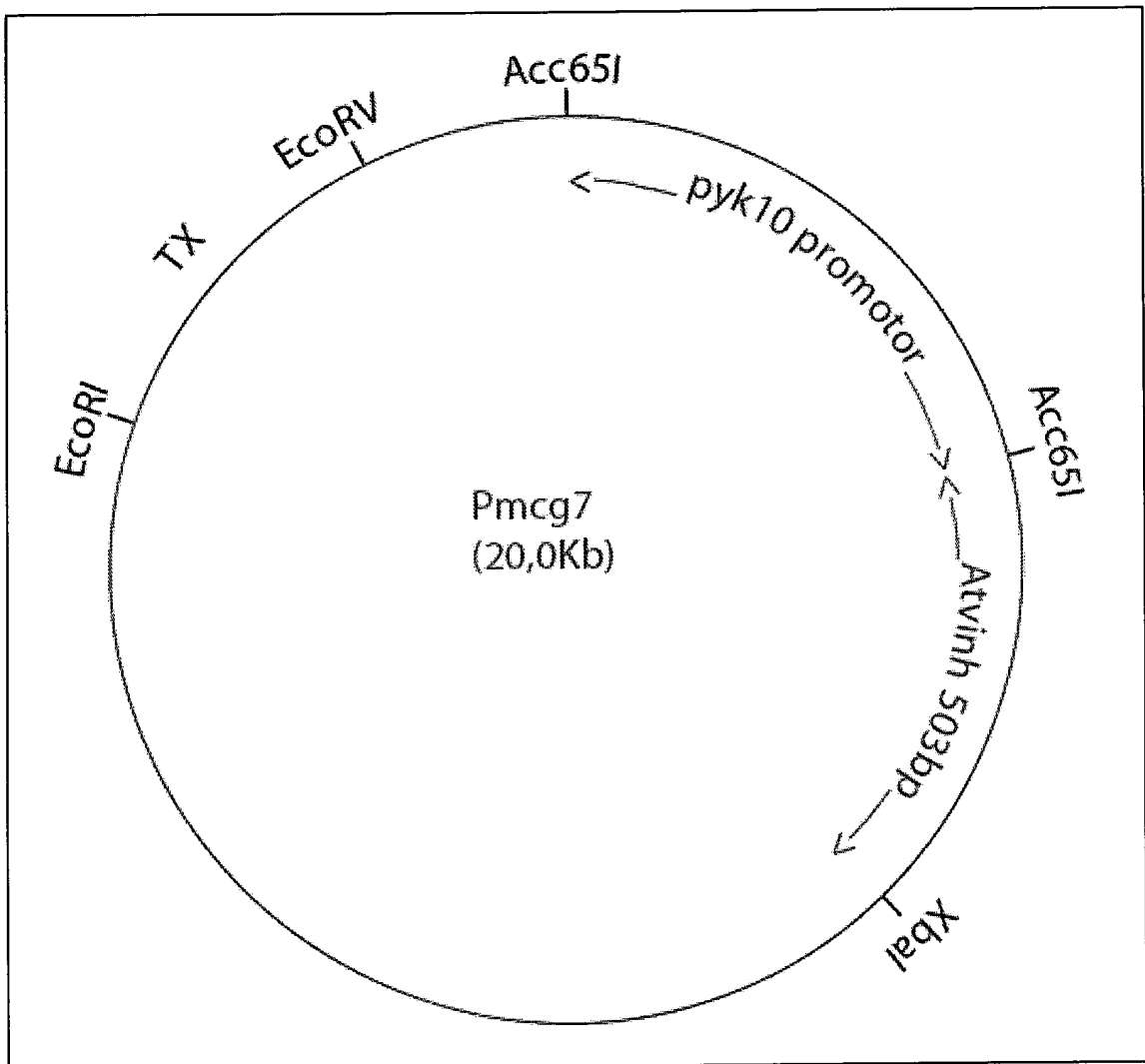


Fig. 25

| | | | |
|---|--|---|---|
| Plasmid name: <u>pmcg6-12,4 (A1, A2, A3 in A, b)</u> | | Plasmid Data Sheet No.: <u>MG-8</u> | |
| Description: <u>Bin-K_g-Tx Pyk10: <i>Arca</i></u> | | | |
| Selection marker(s) | | Size (bp): | Host strain(s): |
| Prokaryotic: <u>km</u> | Eukaryotic: <u>K_g</u> | <u>2010K10</u> | <u>DUSK, UBA401(A, b)</u> |
| Insert | Gene name: <u>Pyk10 promoter</u> | Organism: <u>At</u> | <input type="checkbox"/> cDNA <input checked="" type="checkbox"/> genomic DNA |
| Source | <input checked="" type="checkbox"/> Plasmid - name: <u>pmo1-18</u> <input type="checkbox"/> RNA - isolated from: <input type="checkbox"/> Genomic DNA - isolated from: <input type="checkbox"/> other: | | |
| Restriction/modifying enzymes used: | | Primers & annealing temper. for RT/PCR: | Size (bp): |
| <u>Acc65x</u> | | | <u>MG 6</u> |
| Vector Name: | Type: | Restriction/modifying enzymes used: | Size (bp): |
| <u>pmcg4-5</u> | <u>Bin</u> | <u>Acc65x</u> | <u>18'S K10</u> |
| Remarks on cloning strategy and use: | | | |
| <u>* can used in transformation (of E. coli).</u> | | | |
| <u>For checked by RB of <i>Arca</i> genomic DNA.</u> | | | |
| Path & File(s) with Sequence(s)/Accession No.: | | Path and File with Plasmid MAP: | |
| | | | |
| Constructed by: | Time period: | Lab book no./pp.: | Publication: |
| <u>MaiCra Garcia</u> | <u>20-Aug-03</u> | <u>LAB BOOK #1</u> | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Glycerol(s) | | DNA: <input type="checkbox"/> Miniprep / <input checked="" type="checkbox"/> Midiprep | |
| No(s) in Personal Archive: <u>37, 38, 39, 52, 53, 54</u> | | Storage (Box No./Position.): <u>MaiCra -28</u> | |
| No(s) in Glycerol Data Base: <u>120, 121, 122, 135, 136, 137</u> | | <u>(copy 1)</u> | |
| Storage (Box No./Position): <u>FA</u> | | | |
| Please append on a separate sheet a hand drawn or electronically generated plasmid MAP including key restriction enzyme sites! | | | |

Fig. 26

| | | | |
|---|--|--|---|
| Plasmid name: pMG 7-6, AB, AA, AA A.A.B. | | Plasmid Data Sheet No.: MG-9 | |
| Description: Bin-Hyg-Tx P.K. 10: At 1.1111 | | | |
| Selection marker(s) | | Size (bp): | Host strain(s): |
| Prokaryotic: <i>Kan</i> | Eukaryotic: <i>Hyg</i> | 20 kb | DUSA, LBA4401 (AT) |
| Insert | Gene name: <i>P.K. 10 promoter</i> | Organism: <i>At</i> | <input type="checkbox"/> cDNA <input checked="" type="checkbox"/> genomic DNA |
| Source | <input checked="" type="checkbox"/> Plasmid - name: <i>pMG1-18</i> <input type="checkbox"/> RNA - isolated from: <input type="checkbox"/> Genomic DNA - isolated from: <input type="checkbox"/> other: | | |
| Restriction/modifying enzymes used: <i>Acc 65c</i> | | Primers & annealing temper. for RT/PCR: | Size (bp): <i>1467 bp</i> |
| Vector Name: <i>pMG 5.3</i> | Type: <i>Bin</i> | Restriction/modifying enzymes used: <i>Acc 65c</i> | Size (bp): <i>18546</i> |
| Remarks on cloning strategy and use: | | | |
| <i>* Colony 5 used for RNA transcription (of E.coli)</i> | | | |
| <i>RNA isolated by RFL of isolated genomic DNA.</i> | | | |
| Path & File(s) with Sequence(s)/Accession No.: | | Path and File with Plasmid MAP: | |
| | | | |
| Constructed by: <i>Naikna Sanyal</i> | Time period: <i>20-Aug-03</i> | Lab book no./pp.: <i>LAB BOOK pt 1</i> | Publication: |
| <input checked="" type="checkbox"/> Glycerol(s) | | DNA: <input type="checkbox"/> Miniprep / <input checked="" type="checkbox"/> Midiprep | |
| No(s) in Personal Archive: <i>40, 41, 55, 56, 57</i> | | Storage (Box No./Position.): <i>Naikna - 2PC (colony 5)</i> | |
| No(s) in Glycerol Data Base: <i>123, 124, 132, 139, 140</i> | | | |
| Storage (Box No./Position): <i>F1</i> | | | |
| Please append on a separate sheet a hand drawn or electronically generated plasmid MAP including key restriction enzyme sites! | | | |

Fig. 27

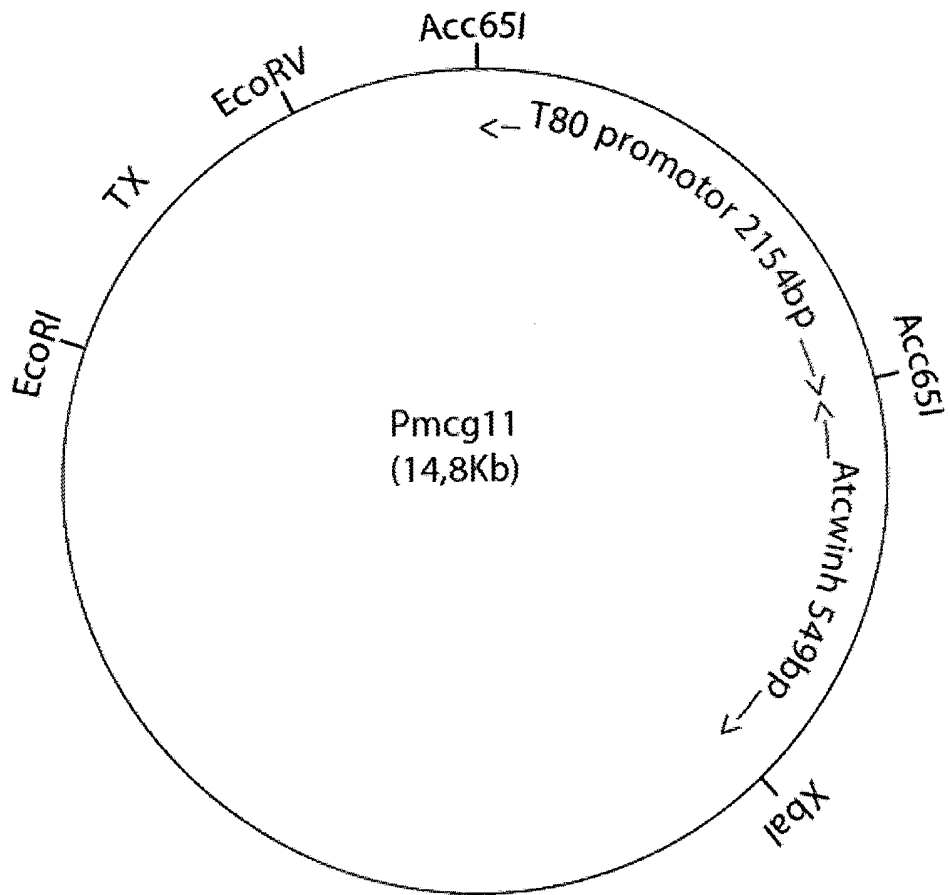


Fig. 28

| | | | |
|--|-------------------------------|--|---|
| Plasmid name: pmcg11-2, 3, 4, 9, A2, A3 | | Plasmid Data Sheet No.: MCG-13 | |
| Description: T80 cryptic-promoter: Atcwinh in BIN-Hyg-Tx plasmid | | | |
| Selection marker(s) | | Size (bp): 14800 bp | Host strain(s): DH5a, LBA4404 (A2, A3) |
| Prokaryotic: Km | Eukaryotic: Hy | | |
| Insert | Gene name: T80 cryptic prom | Organism: At | cDNA genomic DNA |
| Source | Plasmid - name: | RNA - isolated from: | Genomic DNA - isolated from: other: X7-KS |
| Restriction/modifying enzymes used: Acc65I-Acc65I | | Primers & annealing temper. for RT/PCR: 55°C cryp-F/cryp-R (with High Fidelity Taq) | Size (bp): 2154 bp |
| Vector Name: pmcg6-1 | Type: B | Restriction/modifying enzymes used: Acc65I-Acc65I | Size (bp): 14092 |
| Remarks on cloning strategy and use: | | | |
| T80 promoter is amplified from X7-KS plasmid and restricted with Acc65I. pmcg6-1 is cut with Acc65I | | | |
| and the band corresponding to the plasmid (without pyk10 promoter) used for the clonings. Colony 9 | | | |
| is chosen for sequencing of promoter and <i>Agrobacterium</i> transformation. | | | |
| Path & File(s) with Sequence(s)/Accession No.: | | Path and File with Plasmid MAP: AGRoitsch/MariCruz/sequences/Vector NTI files/ pmcg11-9 | |
| Constructed by: MariCruz González | Time period: 10-9/23-10-03 | Lab book no./pages: #1 | Publication: |
| Glycerol(s) | | DNA: | Miniprep / Midiprep |
| No(s) in Personal Archive: <u>67, 68, 69, 70, 83, 84</u> | | Storage (Box No./Position.): Colony 9 MariCruz -20°C | |
| No(s) in Glycerol Data Base: <u>158,159,160,161,174,175</u> | | | |
| Storage (Box No./Position): <u>F2</u> | | | |
| Please append on a separate sheet a hand drawn or electronically generated plasmid MAP including key restriction enzyme sites! | | | |

Fig. 29

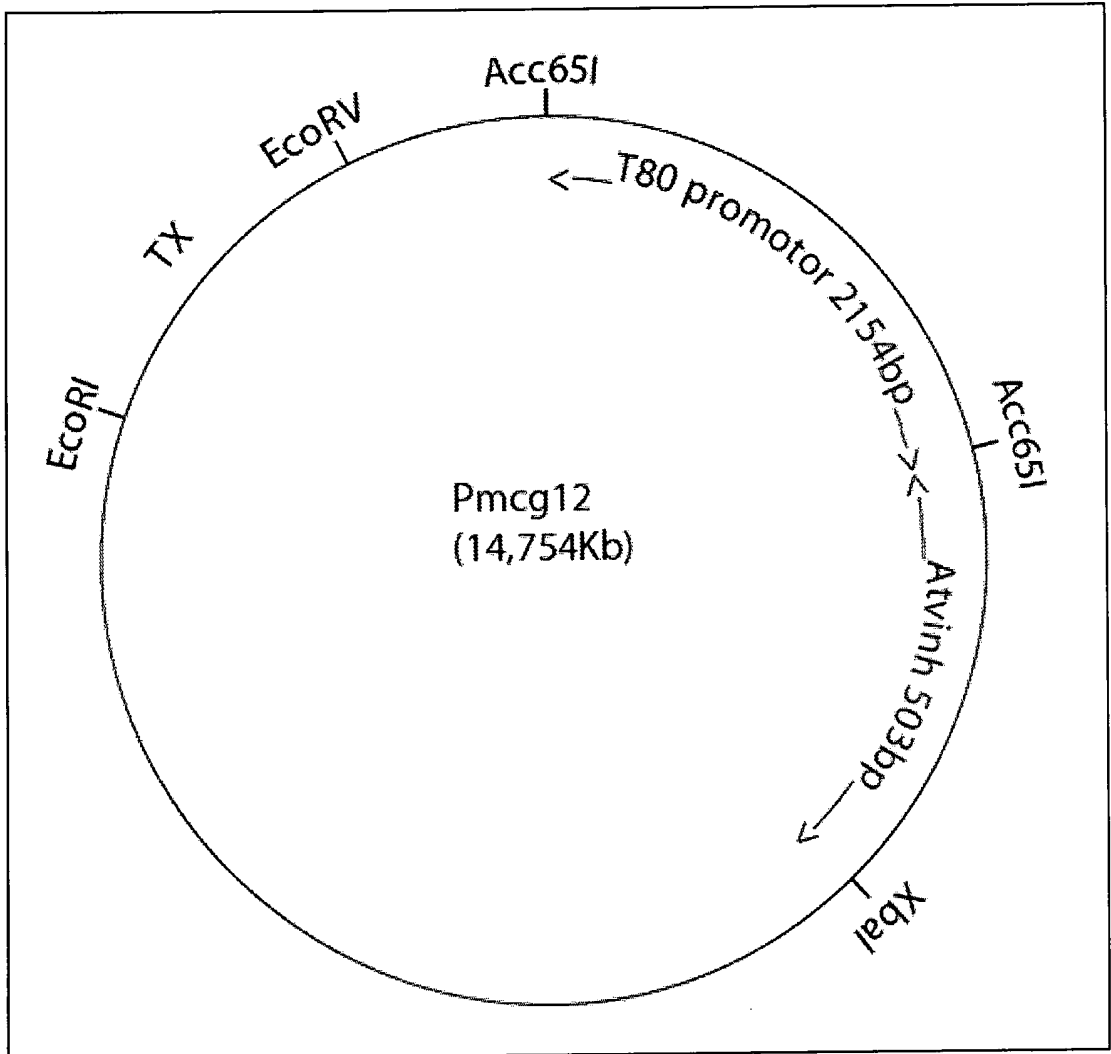


Fig. 30

| | | | |
|--|--------------------------------------|--|--|
| Plasmid name: pmcg12-1, A2, A3 | | Plasmid Data Sheet No.: MCG-14 | |
| Description: T80 cryptic-promoter: Atvinh in BIN-Hyg-Tx plasmid | | | |
| Selection marker(s) | | Size (bp): 14754 bp | Host strain(s): DH5a, LBA4404 (A2, A3) |
| Prokaryotic: Km | Eukaryotic: Hy | | |
| Insert | Gene name: T80 cryptic prom | Organism: At | cDNA genomic DNA |
| Source | Plasmid - name: RNA - isolated from: | Genomic DNA - isolated from: | other: X7-KS |
| Restriction/modifying enzymes used: <i>Acc65I-Acc65I</i> | | Primers & annealing temper. for RT/PCR: 55°C cryp-F/cryp-R (with High Fidelity Taq) | Size (bp): 2154 bp |
| Vector Name: pmcg7-5 | Type: B | Restriction/modifying enzymes used: <i>Acc65I-Acc65I</i> | Size (bp): 14046 |
| Remarks on cloning strategy and use: | | | |
| T80 promoter is amplified from X7-KS plasmid and restricted with <i>Acc65I</i> . pmcg7-5 is cut with <i>Acc65I</i> | | | |
| and the band corresponding to the plasmid (without <i>pyk10</i> promoter) used for the clonings. Colony 1 | | | |
| is chosen for sequencing of promoter and <i>Agrobacterium</i> transformation. | | | |
| Path & File(s) with Sequence(s)/Accession No.: | | Path and File with Plasmid MAP: AGRoitsch/MariCruz/sequences/Vector NTI files/ pmcg12-1 | |
| Constructed by: MariCruz González | Time period: 10-9/23-10-03 | Lab book no./pages: #1 | Publication: |
| Glycerol(s) | | DNA: Miniprep / Midiprep | |
| No(s). in Personal Archive: <u>71, 85, 86</u> | | Storage (Box No./Position.): Colony 1 MariCruz -20°C | |
| No(s) in Glycerol Data Base: <u>162, 176, 177</u> | | | |
| Storage (Box No./Position): <u>F2</u> | | | |
| Please append on a separate sheet a hand drawn or electronically generated plasmid MAP including key restriction enzyme sites! | | | |

Fig. 31

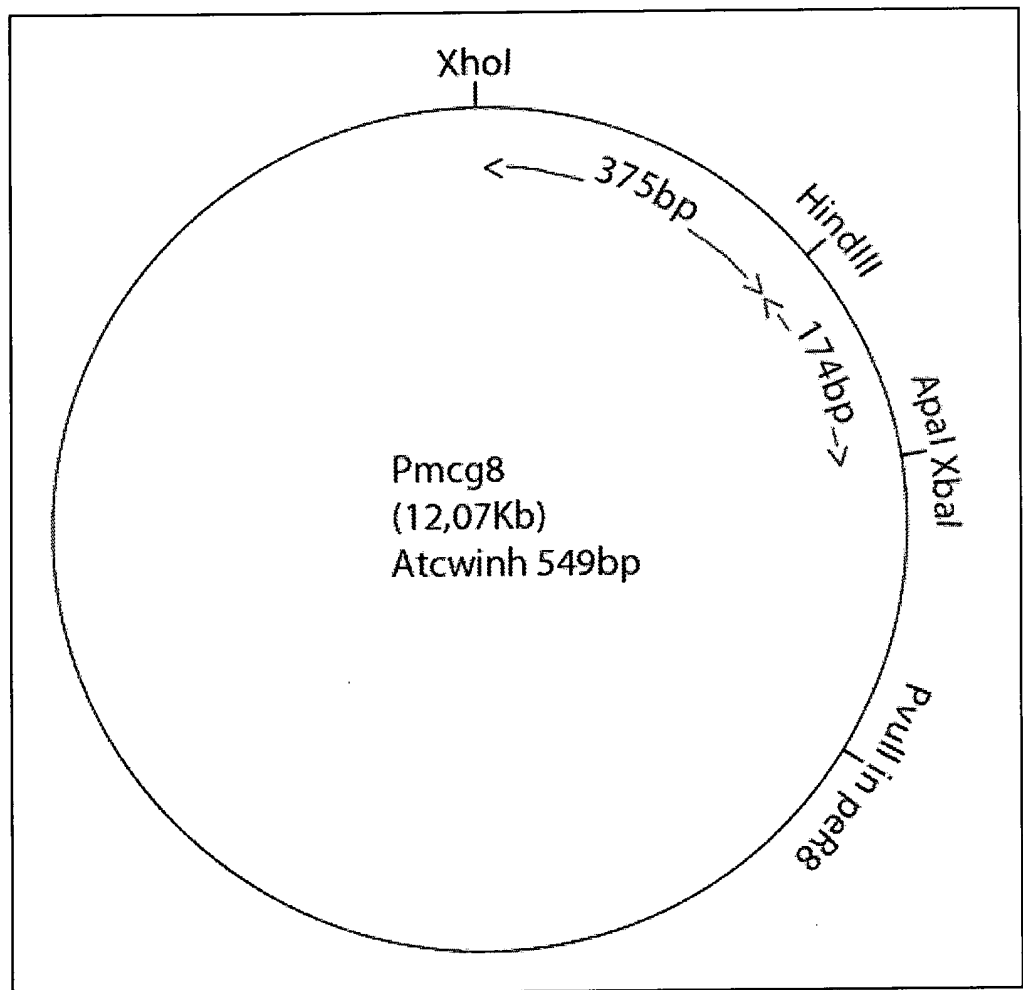


Fig. 32

| | | | |
|---|---|---|---|
| Plasmid name: <i>pvec 8-3,5,6, A5, A6, A7</i> | | Plasmid Data Sheet No.: <i>MOB-10</i> | |
| Description: <i>Attenuin in astrocyte regulated pvec</i> | | | |
| Selection marker(s) | | Size (bp): | Host strain(s): |
| Prokaryotic: <i>Sp</i> | Eukaryotic: <i>hy</i> | <i>12'09 kb</i> | <i>DM5x, LBAN404 (AS-A7)</i> |
| Insert | Gene name: | Organism: | <input checked="" type="checkbox"/> cDNA <input type="checkbox"/> genomic DNA |
| Source | <input checked="" type="checkbox"/> Plasmid - name: <i>pvec 2-4</i> <input type="checkbox"/> RNA - isolated from: <input type="checkbox"/> Genomic DNA - isolated from: <input type="checkbox"/> other: | | |
| Restriction/modifying enzymes used: | | Primers & annealing temper. for RT/PCR: | Size (bp): |
| <i>XhoI - ApsI</i> | | | <i>549 pb</i> |
| Vector Name: | Type: | Restriction/modifying enzymes used: | Size (bp): |
| <i>pvec</i> | <i>Binary</i> | <i>XhoI - ApsI</i> | <i>11522 pb</i> |
| Remarks on cloning strategy and use: | | | |
| | | | |
| | | | |
| Path & File(s) with Sequence(s)/Accession No.: | | Path and File with Plasmid MAP: | |
| | | | |
| Constructed by: | Time period: | Lab book no./pp.: | Publication: |
| <i>Kaichun Guo</i> | <i>Sept. 03</i> | <i>LAB BOOK # 1</i> | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Glycerol(s) | | DNA: <input type="checkbox"/> Miniprep / <input checked="" type="checkbox"/> Midiprep | |
| No(s) in Personal Archive: <i>44, 45, 46, 53, 59, 60</i> | | Storage (Box No./Position.): <i>at colony 5</i> | |
| No(s) in Glycerol Data Base: <i>123, 128, 129, 149, 150, 151</i> | | <i>Kaichun - 20c</i> | |
| Storage (Box No./Position): <i>FA</i> | | | |
| Please append on a separate sheet a hand drawn or electronically generated plasmid MAP including key restriction enzyme sites! | | | |

Fig. 33

| | | | |
|---------------|------------------------|-------------------------|--------|
| Plasmid name: | pmc9-3,6,8,11, A5A6,A7 | Plasmid Data Sheet No.: | HCG-11 |
|---------------|------------------------|-------------------------|--------|

Description: *Atglin in estofen - in dicitie spau (p628)*

| | | | |
|------------------------|------------------------|------------------|-----------------------------|
| Selection marker(s) | | Size (bp): | Host strain(s): |
| Prokaryotic: <i>sp</i> | Eukaryotic: <i>hvg</i> | <i>12,025 bp</i> | <i>DMSA, LBANUOY (A5A7)</i> |

| | | | |
|--------|--|-----------|--|
| Insert | Gene name: | Organism: | <input type="checkbox"/> cDNA <input type="checkbox"/> genomic DNA |
| Source | <input checked="" type="checkbox"/> Plasmid - name: <i>pmc9-3-11</i> <input type="checkbox"/> RNA - isolated from: <input type="checkbox"/> Genomic DNA - isolated from: <input type="checkbox"/> other: | | |

| | | |
|-------------------------------------|---|--------------|
| Restriction/modifying enzymes used: | Primers & annealing temper. for RT/PCR: | Size (bp): |
| <i>XhoI - AgeI</i> | | <i>508pb</i> |

| | | | |
|--------------|---------------|-------------------------------------|-----------------|
| Vector Name: | Type: | Restriction/modifying enzymes used: | Size (bp): |
| <i>p628</i> | <i>Binary</i> | <i>XhoI - AgeI</i> | <i>11522 pb</i> |

Remarks on cloning strategy and use:

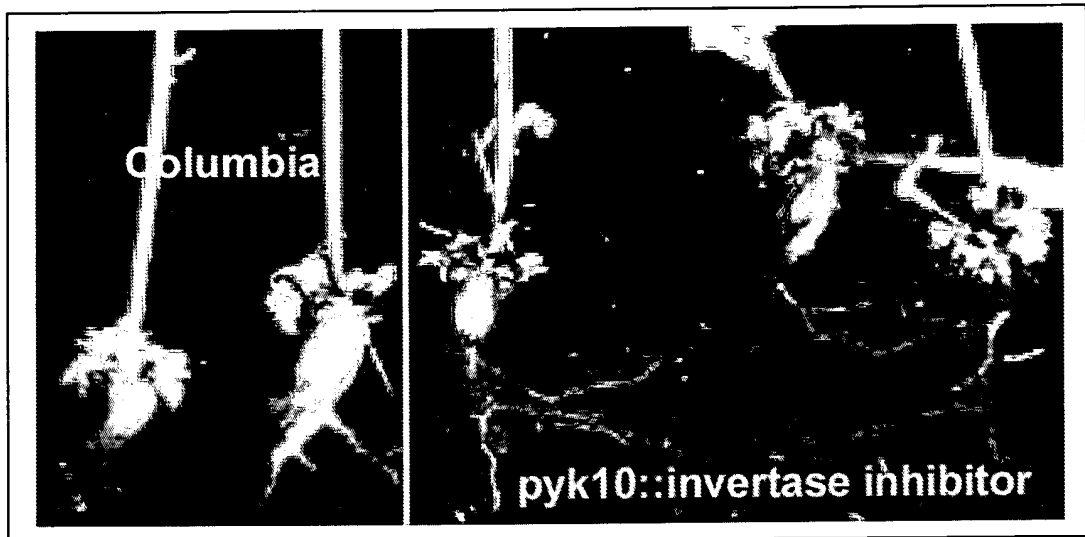
| | |
|--|---------------------------------|
| Path & File(s) with Sequence(s)/Accession No.: | Path and File with Plasmid MAP: |
|--|---------------------------------|

| | | | |
|------------------------|-----------------|--------------------|--------------|
| Constructed by: | Time period: | Lab book no./pp.: | Publication: |
| <i>HANICAR SPANICA</i> | <i>SEPT. 03</i> | <i>LAB BOOK #1</i> | |

| | |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Glycerol(s) | DNA: <input type="checkbox"/> Miniprep / <input checked="" type="checkbox"/> Midiprep |
| No(s) in Personal Archive: <i>47, 48, 49, 50, 61, 62, 63</i> | Storage (Box No./Position.): <i>60403 3</i> |
| No(s) in Glycerol Data Base: <i>130, 131, 132, 133, 152, 153, 154</i> | <i>HANICAR. - 20C</i> |
| Storage (Box No./Position): <i>F1</i> | |

Please append on a separate sheet a hand drawn or electronically generated plasmid MAP including key restriction enzyme sites!

Fig. 34



| Line | Disease index |
|-------------------------------------|---------------|
| Pyk10::InvCW-Inh-1 | 0.67 |
| Pyk10::InvCW-Inh-2 | 0.65 |
| Cryptic-T80::InvCW-Inh three copies | 0.56 |
| Cryptic-T80::InvCW-Inh-1 one copy | 0.75 |
| Cryptic-T80::InvCW-Inh-2 one copy | 0.79 |

Fig. 35

| Single Invertase KOs | |
|----------------------|---------------|
| Line | Disease index |
| At3g13790 | 1.00 |
| At3g52600 | 0.69 – 1.00 |
| At2g36190 | 1.00 |
| Columbia | 1.00 |
| WS | 1.00 |

Fig. 36

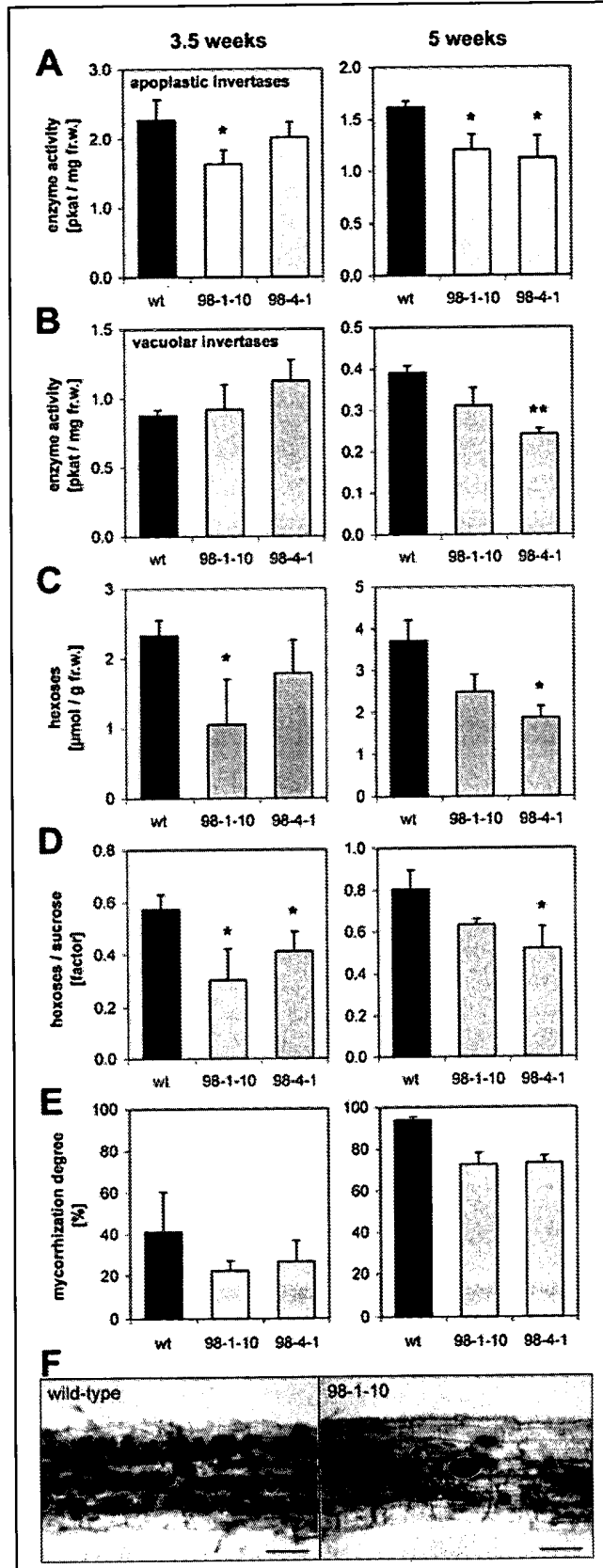


Fig. 37

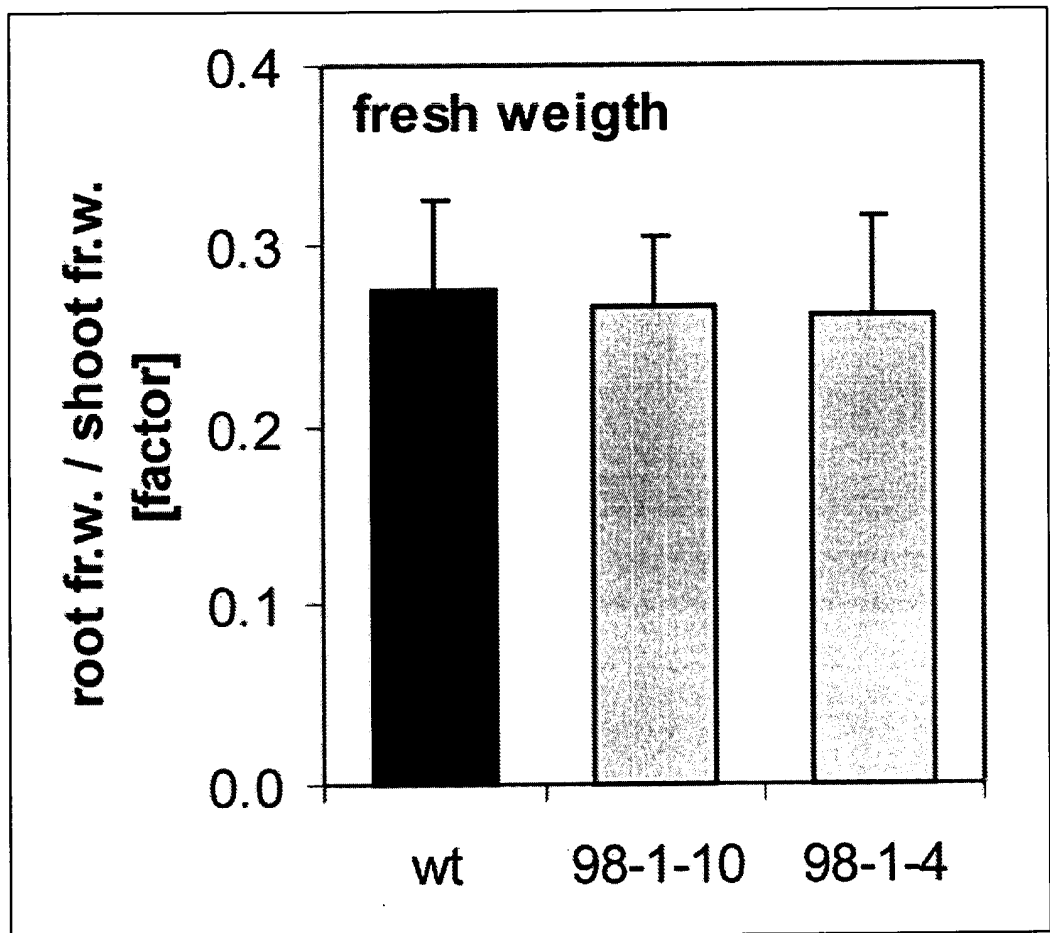
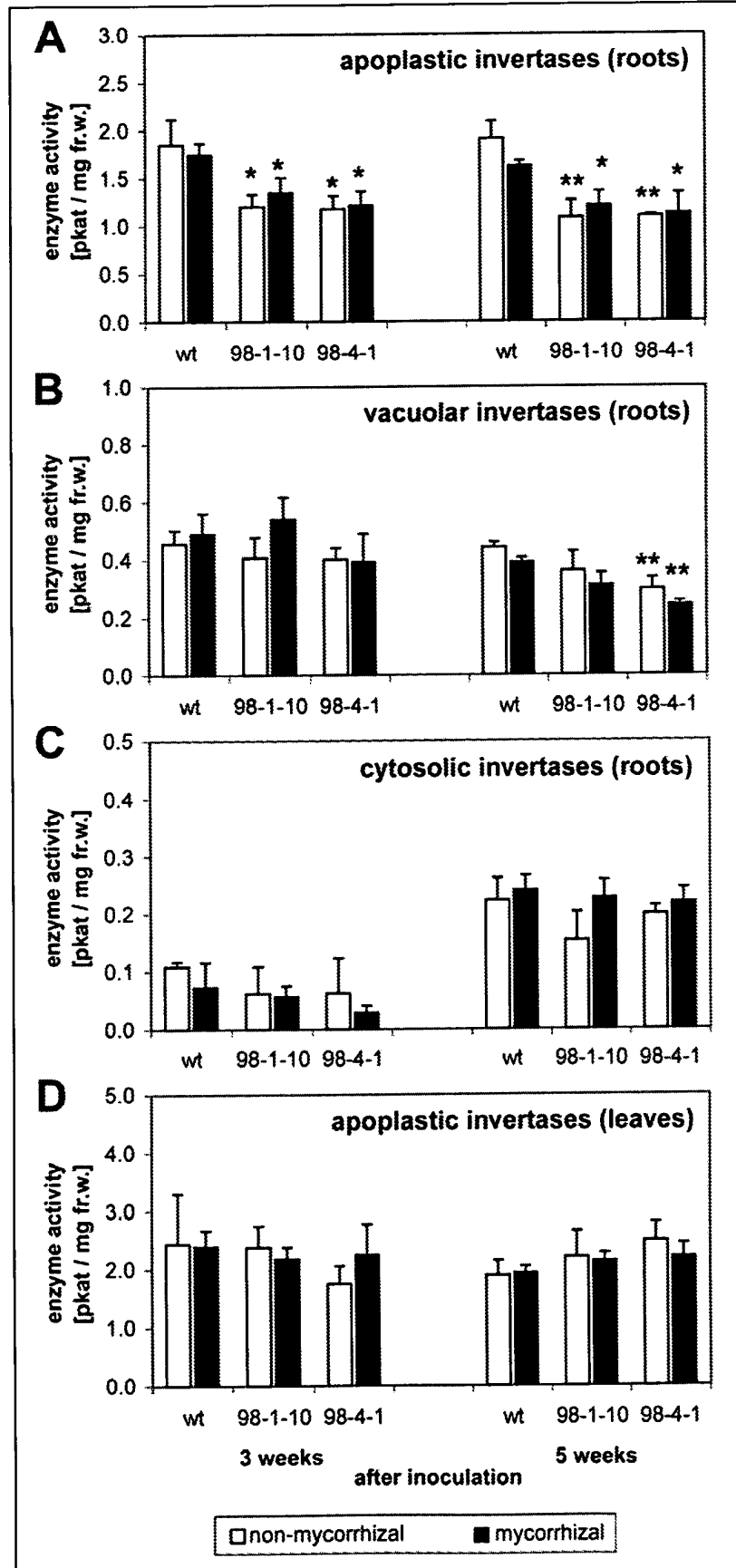


Fig. 38



P10708694-6

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODOS PARA AUMENTAR A PROPORÇÃO DE BROTO PARA RAIZ, A PRODUÇÃO DE SEMENTES E A RESISTÊNCIA A DOENÇAS".

- 5 A presente invenção refere-se a um método para aumentar a proporção de broto para raiz de uma planta compreendendo a etapa de inibir a atividade de uma invertase no tecido da raiz da referida planta.