(11) Número de Publicação: **PT 1435205 E**

(51) Classificação Internacional:
A23L 1/522 (2007.10) ***C12N 15/82*** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1996.09.19**

(30) Prioridade(s): **1995.09.19 DE 19534759**
1995.12.20 DE 19547733

(43) Data de publicação do pedido: **2004.07.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.11.11**
024/2010

(73) Titular(es):
BAYER BIOSCIENCE GMBH
HERMANNSWERDER 20A 14473 POTSDAM DE

(72) Inventor(es):
JENS KOSSMANN **ZA**
RUTH LORBERTH **US**

(74) Mandatário:
MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **PLANTAS QUE SINTETIZAM UM AMIDO MODIFICADO, PROCESSO PARA A SUA PRODUÇÃO E AMIDO MODIFICADO**

(57) Resumo:

RESUMO

"PLANTAS QUE SINTETIZAM UM AMIDO MODIFICADO, PROCESSO PARA A SUA PRODUÇÃO E AMIDO MODIFICADO"

A presente invenção refere-se a moléculas de ácido nucleico que codificam uma proteína ligada ao grânulo de amido e um processo e moléculas de ADN recombinante para a produção de células de plantas transgénicas e de plantas que sintetizam um amido modificado com as propriedades de viscosidade alteradas e um teor de fosfato alterado. Também tem por objecto as plantas e as células de plantas que resultam do processo e o amido assim obtido.

DESCRIÇÃO

"PLANTAS QUE SINTETIZAM UM AMIDO MODIFICADO, PROCESSO PARA A SUA PRODUÇÃO E AMIDO MODIFICADO"

A presente invenção refere-se a um método para a produção de um amido, no qual são isolados amidos de plantas transgénicas ou de células de plantas, as quais forma modificadas, através de moléculas de ácido nucleico que codificam uma proteína ligada ao granulo de amido.

O amido de polissacárido que constitui uma das substâncias de armazenagem mais importantes das plantas não se utiliza apenas na área dos comestíveis, mas também desempenha um papel significativo como um material de regeneração na produção de produtos industriais. Para tornar possível a utilização desta matéria-prima em tantas áreas quantas as possíveis, é necessário obter uma grande variedade de substâncias assim como adaptar essas substâncias aos vários requisitos da indústria do processo.

Embora o amido consista num componente básico, homogéneo sob o ponto de vista químico, nomeadamente a glicose, não constitui uma matéria-prima homogénea. É uma mistura bastante complexa de vários tipos de formas moleculares diferentes que diferem umas das outras no seu grau de polimerização e no grau de ramificação das cadeias de glicose. Diferencia-se particularmente entre amido-amilose, um polímero basicamente não ramificado feito de moléculas de glicose ramificadas de forma α-1,4-glicosídica e amido-amilopectina que, por sua

vez, é uma mistura de cadeias de glicose mais ou menos altamente ramificadas, em que a ramificação resulta da ocorrência de interligações α-1,6-glicosídicas.

A estrutura molecular do amido que é determinada principalmente pelo seu grau de ramificação, a relação amilosa/amilopectina, o comprimento médio da cadeia e a ocorrência de grupos de fosfato, é significativa para as propriedades funcionais importantes do amido ou das suas soluções aquosas. As propriedades funcionais importantes são, por exemplo, a solubilidade do amido, a tendência para retrogradar, a capacidade de formação de filmes, a viscosidade a estabilidade da cor, as propriedades de formação de pasta, isto é, as propriedades de ligação e de colagem, assim como a resistência ao frio. A dimensão do grânulo de amido pode ser também ser significativa em várias utilizações. A produção de amido com um teor de amilose alto é particularmente significativa. Além disso, o amido modificado contido nas células de plantas pode, em certas condições, alterar favoravelmente o comportamento da célula da planta. Por exemplo, seria possível diminuir a degradação do amido durante a armazenagem dos órgãos contendo amido tal como sementes e tubérculos, antes do seu posterior tratamento por meio de, por exemplo, extracção do amido. Além disso, há algum interesse na produção de amidos modificados que tornarão as células das plantas e os órgãos das plantas contendo este amido mais apropriados para posterior tratamento, tal como para a produção de pipocas ou "Corn flakes" a partir de batata ou de batatas fritas, batatas onduladas ou pó de batata a partir de batatas. Há um

interesse particular na melhoria dos amidos de tal modo que eles exibem um "adoçamento a frio" (cold sweetening) reduzido, isto é, uma libertação diminuída dos açúcares de redução (especialmente glicose) durante uma armazenagem de longo prazo, a baixas temperaturas. Em particular, as batatas são muitas vezes armazenadas a temperaturas de 4-8 °C de modo a minimizar a degradação do amido durante a armazenagem. Os açúcares redutores assim libertados, em particular a glicose, levam a reacções indesejadas que tornam o produto acastanhado (as chamadas reacções de Maillard) na produção de batatas fritas em palitos e batatas onduladas.

O amido que pode ser isolado das plantas é muitas vezes adaptado a certos fins industriais por meio de modificações químicas que são normalmente consumidoras de tempo e caras. Por isso, é desejável encontrar possibilidades para produzir plantas que sintetizem um amido cujas propriedades já cumprem os requisitos da indústria transformadora.

Os processos convencionais para a produção dessas plantas são processos clássicos de criação e de produção de mutantes. Assim, por exemplo, produziu-se um mutante a partir de amido sintetizado do milho, com uma viscosidade alterada (patente de invenção norte-americana U.S. No. 5,331,108) e estabeleceu-se uma variedade de milho (waxi maize) por meio da criação, cujo amido consiste em quase 100% de amilopectina (Akasuka e Nelson, J. Biol. Chem. 241 (1966), 2280-2285). Além disso, descreveram-se mutantes de batata e de ervilha que sinterizam amidos com um elevado teor de amilose (70% no milho e até 50% nas ervilhas). Estes mutantes até agora não

foram caracterizados ao nível molecular e, por isso, não permitem a produção dos mutantes correspondentes noutras plantas que armazenam amido.

Alternativamente, as plantas que sintetizam amido com propriedades alteradas podem ser produzidas por meio de técnicas de ADN recombinante. Em vários casos, por exemplo, a modificação recombinante de plantas de batata que levam a uma alteração do amido sintetizado nessas plantas está descrita (por exemplo, patentes de invenção WO 92/11376; WO 92/14827). Contudo, para utilizar as técnicas da tecnologia dos genes, são necessárias sequências de ADN cujos produtos dos genes influenciam a síntese do amido, a modificação do amido ou a degradação do amido.

Por isso, o problema subjacente à presente invenção, consiste em providenciar moléculas de ácidos nucleicos e processos que permitem a alteração de plantas de tal modo que sintetizam um amido que difere do amido sintetizado naturalmente em plantas, no que respeita às suas propriedades físicas e/ou químicas, em particular um amido contendo um alto teor de amilose e é por isso mais apropriado para as utilizações gerais ou particulares.

Este problema tem sido resolvido por meio dos enquadramentos descritos nas presentes reivindicações.

Por isso, a presente invenção descreve moléculas de ácido nucleico que codificam uma proteína com a sequência de aminoácidos indicada na Seq ID n°2. Essas proteínas estão

presentes nos plastídeos das células das plantas, ligadas aos grânulos de amido, assim como na forma livre, isto é, na forma solúvel. Durante a expressão de *E. coli*, a actividade da enzima dessas proteínas levam a uma fosforilação aumentada do glicogénio sintetizado dentro das células. O peso molecular destas proteínas está dentro do intervalo de 140 a 160 kD se for determinado por meio de electroforese em gel de SDS.

A presente invenção tem ainda por objecto moléculas de ácido nucleico que compreendem uma sequência com a sequência de nucleótidos indicada na Seq ID nº 1, particularmente a região de codificação indicada na Seq ID nº 1.

São igualmente descritas moléculas de ácidos nucleicos que codificam uma proteína da batata, a qual, nos plastídeos das células, está particularmente ligada aos grânulos e hidridiza com as moléculas de ácidos nucleicos mencionadas antes na presente invenção ou a sua helicoidal complementar são também matéria da presente invenção. Neste contexto, o termo "hibridização" significa a hibridização em condições de hibridização convencionais, preferencialmente em condições severas, tal como descrito, por exemplo, em Sambrook et al., (Molecular Cloning, A Laboratori Manual, 2ª Edição (1989) Cold Spring Harbor Laboratori Press, Cold Spring Harbor, N.J.). Estas moléculas de ácido nucleico que hibridizam com as moléculas de ácido nucleico descritas em cima, podem ser derivadas principalmente de qualquer organismo desejado (isto é, procarióticas ou eucarióticas, em particular de bactérias, fungos, algas, organismos de plantas ou de animais)

compreendendo essas moléculas de ácidos nucleicos. Derivam principalmente de plantas monocotiledóneas ou dicotelodóneas, particularmente de plantas úteis e, particularmente preferidas, as plantas que armazenam amido.

As moléculas de ácido nucleico que hibridizam com as moléculas descritas em cima podem ser isoladas, por exemplo, a partir de bibliotecas de ADNc ou genómico de vários organismos. Por isso, a identificação e o isolamento dessas moléculas de ácido nucleico podem ter lugar utilizando moléculas de ácido nucleico descritas em cima ou parte dessas moléculas ou, se for caso disso, as helicoidais complementares reversas destas moléculas, por exemplo, por hibridização de acordo com processos normalizados (ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning, A Laboratori Manual, 2ª Edição, Cold Spring Harbor Laboratori Press, Cold Spring Harbor, N.I.).

Como uma sonda de hibridização, podem-se utilizar, por exemplo, moléculas de ácido nucleico, que contêm exactamente ou basicamente a sequência de nucleótidos indicada na Seq ID N° 1 ou partes dela. Os fragmentos de ADN utilizados como sonda de hibridização podem também ser fragmentos de ADN sintéticos que foram produzidos por meio de processos de sintetização ADN comuns e cuja sequência é praticamente idêntica à da molécula de ácido nucleico da presente invenção. Depois da identificação e do isolamento dos genes de hibridização com as sequências de ácido nucleico descritas em cima, a sequência tem de ser determinada e as propriedades

das proteínas codificadas pela sequência têm de ser analisadas.

Para além disso, a presente invenção descreve moléculas de ácido nucleico, cujas sequências são degeneradas como resultado do código genético, em comparação com as sequências das moléculas descritas em cima, e as quais codificam uma proteína, a qual se encontram ligadas parcialmente ao grânulo de amido em células de plantas plastídeas.

São igualmente descritos fragmentos, derivados e variantes alélicas das moléculas de ácidos nucleicos mencionadas antes, que codificam a proteína mencionada antes. Aqui, os fragmentos são partes das moléculas de ácidos nucleicos que são suficientemente longas de modo a codificarem a proteína descrita antes. Neste contexto, o termo derivado significa que as sequências destas moléculas diferem das sequências das moléculas de ácidos nucleicos mencionadas antes em uma ou mais posições e exibem um elevado grau de homologia com as sequências destas moléculas. Aqui, homologia significa que uma identidade da sequência de pelo menos 40%, em particular uma identidade de pelo menos 60%, preferencialmente de mais do que 80% e ainda mais preferencialmente uma identidade da sequência da mais do que 90%. Os desvios das moléculas de ácidos nucleicos descritos antes podem ter sido causados por eliminação, substituição, inserção ou recombinação.

Além disso, homologia significa que existe equivalência funcional e/ou estrutural entre as moléculas de ácidos nucleicos respectivas ou as proteínas que elas codificam. As

moléculas de ácidos nucleicos descritas antes e representam derivados destas moléculas, são geralmente variações das moléculas de ácidos nucleicos que constituem modificações que exercem a mesma função biológica. Estas variações podem ser variações que ocorrem naturalmente, por exemplo, sequências de diferentes organismos ou mutações, em que estas mutações podem ter ocorrido naturalmente ou podem ter sido introduzidas deliberadamente. Além disso, as variações podem ser sequências produzidas sinteticamente.

AS variantes alélicas podem ocorrer tanto naturalmente assim como serem produzidas sinteticamente ou variantes produzidas por técnicas de ADN recombinante.

As proteínas codificadas pelas várias variantes das moléculas de ácidos nucleicos exibem certas características comuns. A actividade da enzima, o peso molecular, a reactividade imunológica, a conformação, etc., podem pertencer a estas características, assim como as propriedades físicas tal como a mobilidade em gel de electroforese, características cromatográficas, coeficientes de sedimentação, solubilidade, propriedades aspectroscópicas, estabilidade, pH óptimo, temperatura óptima, etc.

As moléculas de ácido nucleico descritas podem ser derivadas principalmente de qualquer organismo que expressam as proteínas descritas, derivando preferencialmente de plantas, em particular de plantas que sintetizam amido ou que armazenam amido. Os cereais (tal como cevada, centeio, cevada, trigo, etc.), milho, arroz, ervilhas, mandioca,

batata, etc. são particularmente preferidos. Além disso, podem ser produzidos por meio de processos de síntese conhecidos pelos especialistas na matéria.

As moléculas de ácido nucleico descritas podem ser moléculas de ADN, tal como ADNc ou ADN genómico, assim como moléculas de ARN.

Além disso, são descritos vectores, em particular plasmídeos, cosmideos, vírus, bacteriófagos e outros vectores comuns na engenharia genética, que contêm as moléculas de ácido nucleico da presente invenção mencionadas antes.

São preferidas as moléculas de ácido nucleico contidas nos vectores estão ligadas a elementos reguladores que asseguram a transcrição em células procarióticas e eucarióticas.

São também descritas células hospedeiras, em particular células procarióticas e eucarióticas, que tenham sido transformadas e/ou manipuladas por meio de uma das moléculas de ácidos nucleicos mencionadas antes ou por meio de um vector da presente invenção, assim como as células derivadas dessas células e contendo uma molécula de ácido nucleico acima descrita ou um vector da presente invenção. Preferencialmente, são células de bactérias ou de plantas.

Verificou-se agora que a proteína codificada pelas moléculas de ácidos nucleicos acima descritas influencia a síntese ou a modificação do amido e que altera a quantidade de proteína nas células das plantas conduzindo a alterações no

metabolismo do amido da planta, em particular na síntese de amido com propriedades físicas e químicas modificadas.

Providenciando as moléculas de ácidos nucleicos acima descritas, é assim possível produzir plantas por meio de processos tecnológicos de genes sintetizando um amido modificado que difere do amido sintetizado em plantas do tipo selvagem, no que respeita à sua estrutura e às suas propriedades físicas e químicas. Com esta finalidade, as moléculas de ácidos nucleicos da presente invenção estão ligadas a elementos reguladores que asseguram a transcrição e translação em células de plantas e são introduzidas nas células de plantas.

Assim, são também descritas células de plantas transgénicas que contêm uma molécula de ácido nucleico acima descrita, em que a mesma está ligada a elementos reguladores que asseguram a transcrição em células de plantas. Os elementos reguladores são preferencialmente heterólogos no que respeita à molécula de ácido nucleico. Por meio de processos conhecidos dos especialistas na matéria, as células de plantas transgénicas podem ser regeneradoras e originar plantas inteiras. As plantas que se podem obter por regeneração de células de plantas transgénicas descritas são plantas que contêm as células de plantas transgénicas descritas antes. As plantas transgénicas podem, em princípio, ser plantas de qualquer espécie desejada, isto é, podem ser plantas monocotiledóneas assim como dicotiledóneas. Estas são plantas preferencialmente úteis, em particular plantas que armazenam

amido tal como cereais (tal como cevada, centeio, cevada, trigo, etc.), milho, arroz, ervilhas, mandioca e batata.

Devido à expressão ou à expressão adicional de uma molécula de ácido nucleico da presente invenção, as células de plantas transgénicas e as plantas transgénicas descritas sintetizam um amido que está modificado, quando comparado com o amido de plantas do tipo selvagem, isto é, plantas não transformadas, particularmente no que respeita à viscosidade de soluções aquosas deste amido e/ou ao teor de fosfato. Este último está normalmente aumentado no amido das células de plantas transgénicas ou plantas transgénicas, alterando assim as propriedades físicas do amido.

Descrito é também o amido que se pode obter a partir das células de plantas transgénicas ou plantas transgénicas da presente invenção.

È descrito ainda um processo para a produção de uma proteína que está presente nas células das plantas numa forma ligada a grânulos, assim como sob a forma solúvel, em que se faz uma cultura de células hospedeiras descritas em cima, em condições que permitem a expressão da proteína e em que a proteína é então isolada das células de cultura e/ou do meio da cultura.

São ainda descritas as proteínas codificadas pelas moléculas de ácidos nucleicos acima descritas, assim como proteínas que se podem obter pelo processo descrito antes. São preferencialmente proteínas codificadas por genes nucleares e

que se localizam nos plastídeos. Nos plastídeos, estas enzimas estão presentes sob uma forma ligada a grânulos assim como sob a forma livre. Numa electroforese em gel de SDS, as proteínas respectivas de *Solanum tuberosum* exibiram um peso molecular de 140-160 kD e, durante a expressão de *E.coli*, conduz a uma fosforilação aumentada do glicogénio sintetizado dentro das células.

Verificou-se que é possível influenciar as propriedades do amido sintetizado em células de plantas por meio da redução de quantidade de proteínas codificadas pelas moléculas de ácidos nucleicos, de acordo com a presente invenção, nas células. Esta redução pode ser efectuada, por exemplo, por meio da expressão, em sentido inverso, das moléculas de ácidos nucleicos da presente invenção, expressão de ribozimas apropriados ou co-supressão.

A ressente invenção divulga portanto moléculas de ADN que codificam um ARN de sentido inverso que é complementar dos transcritos de uma molécula de ADN acima descrita são também matéria objecto da presente invenção, assim como estas moléculas de sentido inverso. Aqui, complementar não significa que o ARN codificado tenha de se 100% complementar, mas sim um baixo grau de complementaridade é suficiente, desde que seja suficientemente elevado de modo a inibir a expressão de uma proteína da presente invenção, após a expressão em células de plantas. O ARN transcrito é preferencialmente pelo menos 90% e mais preferencialmente 95% complementar a um transcrito da molécula de ácido nucleico da presente invenção. Para causar um efeito de sentido inverso

duradouro durante a transcrição em células de plantas, essas moléculas de ADN têm um comprimento de pelo menos 15 pb, preferencialmente um comprimento de mais do que 100 pb e, mais preferencialmente, um comprimento de mais do que 500 pb, contudo, normalmente menos do que 5000 pb, preferencialmente mais curto do que 2500 pb.

O pedido divulga ainda moléculas de ADN que, durante a expressão nas células das plantas, leva à síntese de um ARN que, nas células das plantas, devido ao efeito de co-supressão, reduz a expressão de moléculas de ácidos nucleicos acima descritas codificando a proteína descrita. O princípio da co-supressão, assim como a produção das sequências de ADN correspondentes está descrito com precisão, por exemplo, na patente de invenção WO 90/12084. Essas moléculas de ADN codificam preferencialmente um ARN com um elevado grau de homologia com os transcritos das moléculas de ácidos nucleicos acima descritas. Aqui, não é contudo absolutamente necessário que a codificação de ARN seja traduzida numa proteína.

Num outro enquadramento, a presente invenção divulga moléculas de ADN que codificam uma molécula de ARN com actividade de ribozima, cujos transcritos clivam especificamente de uma molécula de ADN descrita em cima.

As ribozimas são moléculas ARN activas sob o ponto de vista catalítico capazes de clivar moléculas de ARN e sequências alvo específicas. Por meio de processos da tecnologia dos genes, é possível alterar a especificidade dos ribozimas. Há

várias classes de ribozimas. Para aplicações práticas que visam a clivagem específica do transcrito de um certo gene, faz-se preferencialmente uso de representantes de dois grupos de ribozimas diferentes. O primeiro grupo é feito de ribozimas que pertencem ao grupo I de intrões do tipo de ribozima. O segundo grupo consiste em ribozimas que, como uma característica estrutural característica exibem a estrutura chamada "cabeça de martelo" (hammerhead). O reconhecimento específico da molécula alvo de ARN pode ser modificado alterando as sequências que flanqueiam esta estrutura. Emparelhando bases com sequências na molécula alvo, estas sequências determinam a posição em que a reacção catalítica e portanto a clivagem da molécula alvo tem lugar. Dado que os requisitos da sequência para uma clivagem eficiente são extremamente baixos, é possível, em princípio, desenvolver ribozimas específicas para praticamente cada molécula de ARN desejada.

Para produzir moléculas de ADN que codificam uma ribozima que cliva especificamente os transcritos de uma molécula de ADN descrita em cima, por exemplo uma sequência de ADN que codifica um domínio catalítico de uma ribozima, estão ligados bilateralmente as sequências de ADN que são homologas às sequências da enzima alvo. As sequências que codificam o domínio catalítico podem ser, por exemplo, o domínio catalítico de ADN satélite do vírus SCMo (Davies *et al.*, Virologi 177 (1990), 216-224) ou o do ADN satélite do vírus TobR (Steinecke *et al.*, EMBO J. 11 (1992), 1525-1530; Haseloff e Gerlach, Natura 334 (1988), 585-591). As sequências de ADN que flanqueiam o domínio catalítico são

derivadas, preferencialmente das moléculas de ADN da presente invenção descritas antes.

Um outro aspecto divulga vectores que contêm as moléculas de ADN descritas antes, em particular aquelas em que as moléculas de ADN descritas estão ligadas a elementos reguladores que asseguram a transcrição em células de plantas.

São ainda descritas células hospedeiras contendo as moléculas de ADN descritas ou os vectores. A célula hospedeira pode ser uma célula procariótica, tal como uma célula bacteriana ou uma célula eucariótica. Preferencialmente, as células eucarióticas hospedeiras são células de plantas.

Além disso, a presente invenção divulga ainda células de plantas transgénicas contendo uma molécula de ADN descrita antes codificando um ARN de sentido inverso, um ribozima ou um ARN que leva a um efeito de co-supressão, em que a molécula de ADN está ligada a elementos de ADN que asseguram a transcrição em células de plantas. Estas células de plantas transgénicas podem ser regeneradas para plantas completas de acordo com técnicas bem conhecidas. Assim, a presente invenção tem por objecto plantas que se podem obter através da regeneração das células de plantas transgénicas descritas, assim como plantas que contém as células de plantas transgénicas descritas. As próprias plantas transgénicas podem ser plantas de qualquer espécie de planta desejada, preferencialmente plantas úteis, particularmente as que armazenam amido, tal como indicado antes.

Devido à expressão das moléculas de ADN descritas que codificam o ARN de sentido inverso, à ribozima ou a um ARN de co-supressão nas células de plantas transgénicas, a quantidade de proteínas codificadas pelas moléculas de ADN acima descritas que estão presentes nas células sob a forma endogénica e reduzida. Surpreendentemente, esta redução leva a uma alteração drástica das propriedades físicas e químicas do amido sintetizado nas células das plantas, em particular no que respeita às propriedades de viscosidade das soluções aquosas deste amido, o teor de fosfato, assim como a libertação de açúcares redutores na armazenagem das células de plantas ou em partes da planta, a baixa temperatura. As propriedades do amido sintetizado nas células de plantas transgénicas são explicitamente descritas aqui.

Assim, é também descrito o amido que se obtêm das células das células plantas transgénicas e das plantas descritas antes.

Além disso, a presente invenção divulga moléculas de ARN de sentido inverso codificadas pelas moléculas de ADN descritas, assim como moléculas de ARN com actividade de ribozima e moléculas de ARN que levam ao efeito de co-supressão que se obtêm, por exemplo, por meio da transcrição.

Num outro aspecto, é descrito é um processo para a produção de células de plantas transgénicas que, em comparação com as células não transformadas, sintetiza um amido modificado, em que a quantidade de proteínas codificadas pelas moléculas de

ADN acima descritas, que estão presentes sob a forma endogénica, é reduzida nas células da planta.

Numa forma de realização, esta redução é efectuada por meio de um efeito de sentido inverso. Com este fim, as moléculas de ADN da presente invenção ou as suas partes são ligadas, numa orientação de sentido inverso, com um promotor que assegura a terminação da transcrição assim como a poliadenilação do transcrito. Para assegurar um efeito de sentido inverso eficiente nas células das plantas, o ARN de sentido inverso sintetizado deve exibir um comprimento mínimo de 15 nucleótidos, preferencialmente de pelo menos 100 nucleótidos e, mais preferencialmente, de mais do que 500 nucleótidos. Além disso, a sequência de ADN que codifica o ARN de sentido inverso deve ser homólogo no que respeita às espécies de plantas a ser transformadas. Contudo, as sequências de ADN que exibem um elevado grau de homologia com as sequências de ADN que estão presentes nas células sob a forma endogénica, podem também ser utilizadas, preferencialmente com uma homologia de mais do que 90% e, mais preferencialmente, com uma homologia de mais do que 95%.

Numa outra forma de realização preferida, a redução da quantidade de proteínas codificadas pelas moléculas de ADN acima descritas é efectuada por um efeito de ribozima. O efeito básico dos ribozimas assim como a construção de moléculas de ADN que codificam essas moléculas de ARN já foi descrito antes. Para expressar um ARN com actividade de ribozima estão ligados com os elementos de ADN que asseguram a transcrição em células de plantas, particularmente com um

promotor e um sinal de terminação. As ribozimas sintetizadas nas células das plantas levam à clivagem de transcritos das moléculas de ADN acima descritas que estão presentes nas células de plantas sob a forma endogénica.

Uma outra possibilidade de reduzir a quantidade de proteínas codificadas pelas moléculas de ácidos nucleicos acima descritas é a co-supressão.

Por isso, as células de plantas obtidas pelo processo descrito são caracterizadas pelo facto de a quantidade de proteínas codificadas pelas moléculas de ADN da presente invenção ser reduzida e por, em comparação com as células de tipo selvagem, sintetizarem um amido modificado.

Além disso, a presente invenção tem por objecto plantas que se obtêm por regeneração das células de plantas descritas, assim como as plantas que contêm as células descritas da presente invenção.

O amido que se obtêm a partir das células de plantas e das plantas descritas na presente invenção, em comparação com os amidos de plantas de tipo selvagem, difere nas suas propriedades físicas e/ou químicas. Por exemplo, este amido contém um teor reduzido de fosfato em comparação com os amidos de plantas do tipo selvagem. Além disso, as soluções aquosas deste amido exibem propriedades de viscosidade modificadas.

Numa forma de realização preferida, o teor de fosfato do amido descrito é reduzido de pelo menos 50 %, mais preferencialmente de pelo menos 75% e, num enquadramento particularmente preferido, de mais de 80% em comparação com o amido derivado de plantas selvagens.

A viscosidade modificada da solução aquosa deste amido é a sua característica mais vantajosa.

Um ensaio bem estabelecido para a determinação de viscosidade é o chamado ensaio de Barbender. Este ensaio realiza-se utilizando uma aplicação que é conhecida, por exemplo, como viscógrafo. Este equipamento é produzido e vendido, entre outros, por Brabender OHG Duisburg (Alemanha).

O ensaio consiste, basicamente, em aquecer primeiro o amido na presença de água de modo a avaliar quando tem lugar a hidratização e o aumento de volume dos grânulos de amido. Este processo, que também é designado por gelatinização ou pastificação, baseia-se na dissolução das ligações de hidrogénio e envolve um aumento mensurável da viscosidade na suspensão de amido. Embora o posterior aquecimento depois da gelatinização conduza à dissolução completa das partículas de amido e à diminuição da viscosidade, o arrefecimento imediato, após a gelatinização normalmente conduz a um aumento da viscosidade (ver fig. 3). O resultado do ensaio de Brabender é um gráfico que mostra a viscosidade em função do tempo, em que, primeiro se aquece a solução acima da temperatura de gelatinização e depois arrefece-se.

A análise do gráfico de Barbender geralmente conduz à determinação da temperatura de pastificação, a viscosidade máxima durante o aquecimento, ao aumento na viscosidade durante o arrefecimento, assim como a viscosidade depois do arrefecimento. Estes parâmetros são características importantes quando se trata da qualidade de um amido e da possibilidade de utilizá-lo para vários fins.

O amido que pode, por exemplo, ser isolado a partir de plantas de batata em que a quantidade de proteínas acima descritas dentro das células foi reduzida por meio de um efeito de sentido inverso, mostrou características que se desviavam fortemente das características do amido isolado das plantas selvagens. Comparado com estas, mostra apenas um aumento ligeiro na viscosidade durante o aquecimento, uma viscosidade máxima baixa, assim como um aumento mais forte na viscosidade durante o arrefecimento (ver fig. 3, 4 e 5).

É por exemplo descrito um amido, cujas soluções aquosas exibem as propriedades de viscosidade características descritas nas figs. 4 ou 5. Particularmente nas condições mencionadas no exemplo 8, para a determinação da viscosidade com a ajuda de um viscosímetro de Brabender, o amido modificado, quando comparado com as plantas de tipo selvagem, exibe a característica de apenas um pequeno aumento na viscosidade quando se aquece a solução. Isto oferece a oportunidade de utilizar o amido para a produção de colas altamente concentradas. Além disso, depois de se atingir a viscosidade máxima, há apenas um pequeno decréscimo na viscosidade no caso do amido modificado. Por outro lado, a

viscosidade aumenta fortemente durante o arrefecimento; assim, a viscosidade do amido modificado é mais elevada do que a viscosidade do amido das plantas de tipo selvagem.

Reduzindo a quantidade de proteínas acima descritas nas células de plantas transgénicas, é além disso possível produzir um amido que tem o efeito que, quando as partes da planta que contêm este amido são armazenadas a temperaturas baixas, em particular a 4-8 °C, libertam-se açucares redutores em quantidades menores do que o caso com amido de células não transformadas. Esta propriedade é particularmente vantajosa, por exemplo, para originar batatas que, durante a armazenagem, a baixas temperaturas, liberta menos açúcares redutores e assim exibe um adoçamento a frio reduzido. Essas batatas são particularmente apropriadas para a produção de batatas em palitos, batatas onduladas ou produtos semelhantes desde que não ocorram reacções que acastanham (reacções de Maillard) indesejáveis ou, pelo menos, são significativamente reduzidas durante a utilização.

De acordo com um outro aspecto, não só a síntese de uma proteína acima descrita é reduzida nas células de plantas transformadas mas, além disso, também a síntese de pelo menos uma outra enzima envolvida na síntese e/ou modificação de amido. Neste contexto, por exemplo, as sintases de amido ligadas a grânulos de amido ou enzimas ramificadas são preferidas. Surpreendentemente, verificou-se que as plantas de batata em que a síntese da proteína da presente invenção assim como da enzima de ramificação é reduzida devida a um efeito em sentido inverso de um amido que as suas

propriedades se desviam fortemente do amido das plantas de tipo selvagem.

Em comparação com o amido de tipo selvagem, as soluções aquosas deste amido modificado não mostram aumento na viscosidade durante o aquecimento ou o arrefecimento (ver fig. 6). Além disso, uma análise microscópica dos grânulos de amido antes e depois do aquecimento mostra claramente que, em comparação com as plantas de tipo selvagem, os grânulos de amido de plantas modificadas de tal modo que não estão abertos mas permanecem praticamente inalterados na sua estrutura. Assim, trata-se de um amido que é resistente ao processo de cozimento. Se o teor de amilose deste amido é determinado por meio do processo descrito nos exemplos, os teores de amilose de mais do que 50%, preferencialmente, de mais do que 60% e, mais preferencialmente, de mais do que 70% são medidos para este amido. As soluções aquosas do amido isolado a partir destas plantas exibem, preferencialmente as propriedades de viscosidade características descritas na fig. 6.

Em comparação com o amido do tipo selvagem, esse amido contendo amilose em alto teor oferece um certo número de vantagens para várias utilizações. Assim, os amidos contendo altos teores de amilose têm um potencial para serem utilizados em folhas metalizada e filmes. As folhas e os filmes produzidos com base em amidos com elevado teor de amilose, que podem ser utilizados em vastas áreas da indústria da embalagem, têm a vantagem essencial de serem biodegradáveis. Independentemente desta utilização que está

basicamente coberta por polímeros clássicos, produzidos petroquimicamente, a amilose têm outros campos únicos de aplicação que são causados pela capacidade da amilose para formar hélices. A hélice formada pela amilose é internamente hidrofóbica e externamente hidrofílica. Devido a isto, a amilose pode ser utilizada para a complezação e encapsulação molecular de substâncias de baixo e alto peso molecular. Exemplos disto são:

- a encapsulação molecular de vitaminas e substâncias para a protecção contra a oxidação, volatilização, degradação térmica ou a transição num ambiente aquoso;
- a encapsulação molecular de substâncias aromáticas para aumentar a solubilidade;
- a encapsulação molecular de fertilizantes/pesticidas para a estabilização e libertação controlada;
- a encapsulação molecular de substâncias medicinais para a estabilização do controlo da dosagem e da libertação controlada de preparações retardantes.

Outra propriedade importante da amilose é o facto de ser uma molécula quirálica. Devido à quiralidade, pode ser preferível que se utilize depois da imobilização, por exemplo, numa coluna para a separação dos enantiómeros.

Além disso, verificou-se, surpreendentemente, que o amido que pode ser isolado a partir de plantas de batata em que a quantidade de proteínas acima descritas nas células foi reduzida devido ao efeito em sentido inverso, em combinação com uma redução das proteínas que exibem a actividade

enzimática de uma sintase de amido ligada aos grânulos de amido do isótopo I (SALGAT) exibem características que se desviam fortemente das características do amido que pode ser isolado das plantas de tipo selvagem. Quando comparadas com o amido das plantas de tipo selvagem, as soluções aquosas deste amido apenas exibem um ligeiro aumento na viscosidade durante o aquecimento, uma viscosidade máxima baixa, assim como praticamente nenhum aumento na viscosidade durante o arrefecimento (ver fig. 7). Quando se determina a relação amilose/amilopectina deste amido, este amido é caracterizado pelo facto de não se medir quase nenhuma amilose. O teor de amilose deste amido está preferencialmente abaixo de 5 % e, mais preferencialmente, abaixo de 2 %. O amido descrito difere, além disso, do amido conhecido que pode ser produzido em plantas transgénicas de batata por inibição do gene da SALGAI unicamente por meio dos processos da tecnologia dos genes. Assim, este amido mostra um forte aumento na viscosidade durante o aquecimento. As soluções aquosas de amido da presente invenção exibem as propriedades de viscosidade características descritas na fig. 7. Particularmente nas condições para a determinação da viscosidade por meio de um analisador de viscosidade rápido descrito no exemplo 13, tendo o amido modificado a característica de exibir apenas um baixo aumento de viscosidade durante o aquecimento quando comparado com o amido de tipo selvagem, mas também quando comparado com o amido do tipo selvagem, mas também quando comparada com amido ceroso. Isto oferece a oportunidade de utilizar o amido acima descrito para a produção de colas altamente concentradas. O amido modificado, além disso, tem a propriedade de haver

apenas um ligeiro decréscimo da viscosidade depois de se atingir a viscosidade máxima, assim como quase nenhum aumento na viscosidade durante o arrefecimento.

As possibilidades de reduzir a actividade de uma enzima ramificada em células de plantas foram já descritas, por exemplo, nas patentes de invenção WO 92/14827 e WO 95/26407. A redução da actividade de uma sintaxe de amido ligada a grânulos de amido do isótopo I (SALGAI) pode ser realizada utilizando processos conhecidos pelos especialistas, por exemplo, por meio de um efeito de sentido inverso. As sequências de ADN que codificam um SALGAI da batata são conhecidas, por exemplo, a partir de Hegersberg (dissertação (1988) Universidade de Colónia), Visser *et al*. (Plant Sci. 64 (1989), 185-192) ou van der Leii *et al*. (Mol. Gen. Genet. 228 (1991), 240-248).

O processo de acordo com a invenção pode ser utilizado, em princípio, para qualquer tipo de espécie de planta. As plantas monocotiledóneas e dicotiledóneas são de interesse, em particular plantas úteis e aqui, preferencialmente as plantas que armazenam amido tal como cereais (cevada, centeio, cevada, trigo, etc.), milho, arroz, ervilhas, mandioca e batatas.

Dentro do significado da presente invenção, a expressão "elementos de ADN reguladores que asseguram a transcrição em células de plantas" está relacionada com as regiões de ADN que permitem a iniciação ou o término da transcrição em células de plantas. As regiões de ADN que asseguram a

iniciação da transcrição são, em particular, promotores. Para a expressão das várias moléculas de ADN da presente invenção descritas antes, pode-se utilizar qualquer promotor que funcione nas células das plantas. O promotor pode ser homólogo ou heterólogo no que respeita às espécies de plantas utilizadas. Pode-se utilizar, por exemplo, o promotor 35S do vírus em mosaico da couve-flor (Odell *et al.*, Natura 313 (1985), 810-812) que assegura uma expressão constitutiva em todos os tecidos de plantas e também da estrutura do promotor descrita na patente de invenção WO/9401571. Contudo, também se podem utilizar promotores que levem a uma expressão das sequências subsequentes apenas num momento determinado por factores exógenos (tal como na patente de invenção WO/9307279) ou num tecido particular da planta (ver, por exemplo, Stockhaus *et al.*, EMBO J. 6 (1989), 2245-2251). Os promotores que são activos nas partes que armazenam amido da planta que vai ser transformada, são os que se utilizam preferencialmente. No caso do milho, estas partes são núcleos, em que, no caso das batatas, estas partes são os tubérculos. Para transformar as batatas, pode-se utilizar, particularmente, mas não exclusivamente, o promotor B33 Rocha-Sosa *et al.*, EMBO J. 8 (1989), 23-29) específico dos tubérculos.

Independentemente dos promotores, as regiões de ADN que iniciam a transcrição podem também conter sequências de ADN que asseguram um outro elemento da transcrição, tal como os chamados elementos melhoradores.

Além disso, a expressão "elementos reguladores de ADN" podem também compreender sinais de terminação que servem para terminar correctamente a transcrição e para adicionar uma cauda de poli-A ao transcrito que se acredita que estabilize os transcritos. Esses elementos estão descritos na literatura e podem-se trocar como se queira. Exemplos dessas sequências da terminação são as regiões 3' não traduzidas, que compreendem o sinal de poliadenilação do gene de nopalisa sintase (gene NOS) ou o gene de octopina sintase ((Gielen *et al.*, EMBO J. 8 (1989), 23-29) da agrobactéria ou as regiões 3' não traduzidas dos genes das proteínas de armazenagem da soja assim como os genes da sub-unidade pequena de ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase (ssRUBISCO).

A introdução das moléculas de ADN acima descritas em células de plantas é realizada, preferencialmente, utilizando plasmídeos. Os plasmídeos que asseguram uma integração estável do ADN no genoma da planta são preferidos.

Nos exemplos da presente invenção, utiliza-se o vector binário pBinAR (Höfgen e Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990), 221-230). Este vector deriva de um vector binário pBin19 (Bevan, Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711-8721), que pode ser obtido comercialmente (Clontech Laboratories, Inc. EUA).

Contudo, pode-se utilizar qualquer vector de transformação de plantas que possa ser inserido numa cassete de expressão e que assegura a integração da cassete de expressão no genoma da planta.

Para preparar a introdução de genes estranhos em plantas superiores, está à disposição um grande número de vectores de clonagem, contendo um sinal de replicação para *E. coli* e um gene marcador para a selecção das células bacterianas transformadas. Exemplos desses vectores são pBR322, séries de pUC, séries de M13mp, pACYC184 etc. A sequência desejada pode ser integrada no vector num sitio de restrição apropriado. O plasmídeo obtido é utilizado para a transformação das células de *E.coli*. Faz-se uma cultura das células de *E. coli* num meio apropriado e em seguida colhem-se e faz-se a lise. Recupera-se o plasmídeo por meio de processos padrão. Como um processo de análise para a caracterização do ADN do plasmídeo obtido, utiliza-se geralmente análise da restrição e análise de sequências. Depois de cada manipulação, pode-se clivar o ADN do plasmídeo e os fragmentos obtidos podem ligar-se a outras sequências de ADN.

Para introduzir o ADN numa célula da planta hospedeira, está disponível uma vasta gama de técnicas. Estas técnicas compreendem a transformação das células das plantas com ADN-T, utilizando *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes* como meio de transformação, a fusão de protoplastos, a injecção e a electroporação de ADN, a introdução de ADN por meio do processo biolístico, assim como outras possibilidades.

No caso de injecção e electroporação de ADN nas células das plantas, não há requisitos especiais para a utilização dos plasmídeos. Os plasmídeos simples tais como os derivados de pUC, podem ser utilizados. Contudo, no caso de serem

regeneradas plantas completas a partir de células transformadas dessa forma, deve estar presente um gene marcador seleccionável.

Consoante o processo de introdução nas células das plantas, dos genes desejados, podem ser necessárias mais sequências de ADN. Se, por exemplo, o plasmídeo Ti ou Ri forem utilizados para a transformação da célula da planta, pelo menos a borda do lado direito, mais frequentemente, contudo, os bordos direito e esquerdo do ADN T dos plasmídeos Ti e Ri têm de ser ligados ao gene estranho a ser introduzido como região de flanqueio.

Se se utilizam Agrobactérias para a transformação, o ADN que se introduz deve ser clonado em plasmídeos especiais, nomeadamente quer num vector intermédio ou num vector binário. Devido aos homólogos de sequências em relação às sequências dentro do ADN-T, os vectores intermédios podem ser integrados no plasmídeo Ti ou Ri da Agrobacterium devido à recombinação homóloga. Esta também contém a região vir necessária para a transferência do ADN-T. Os vectores intermédios não podem replicar na Agrobactéria. Por meio de um plasmídeo auxiliar, o vector intermédio pode ser transferido para *Agrobacterium tumefaciens* (conjugação). Os vectores binários podem replicar em *E. coli*, assim como nas Agrobactérias. Contêm um gene marcador seleccionável assim como um *ligante* ou um *poliligante* que é emoldurado à direita e à esquerda pela região da fronteira de ADN-T. Podem ser transformados directamente numa Agrobactéria (Holsters *et al.* Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 161-187). Os plasmídeos

utilizados para a transformação das Agrobactérias contêm ainda um gene marcador seleccionável, tal como o gene NPT II que permite a selecção das bactérias transformadas. A Agrobacterium que actua como célula hospedeira deve conter um plasmídeo que comporta uma região *vir*. A região *vir* é necessária para a transferência do ADN-T para as células de plantas. O ADN-T adicional pode estar presente. A Agrobacterium transformada dessa maneira é utilizada para a transformação de células de plantas. A utilização de ADN-T para a transformação de células de plantas foi investigada intensamente e descrito suficientemente na patente da invenção europeia EP 120 516, Hoekema, em: The Binari Plant Vector Sistem Offsetdrukkerij Kanters B. V., Alblasserdam (1985), Capitulo V, Fralei *et al*., Crit. Ver. Plant. Sci., 4, 1-46 e An *et al*. EMBO J. 4 (1985), 277-287. Alguns vectores binários podem já ser obtidos comercialmente, tal como pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc., EUA).

Para transferir o ADN para as células das plantas, os explantes das plantas podem ser co-cultivadas apropriadamente com *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agorbacterium rhizogenes*. A partir do material de plantas infectadas (por exemplo, bocados de folhas, segmentos de estema, raízes, mas também protoplastos ou células de plantas em cultura numa suspensão), podem-se então regenerar plantas completas num meio apropriado que pode conter antibióticos ou biózidos para a selecção de células transformadas. As plantas obtidas dessa forma podem então ser examinadas para avaliar se o ADN introduzido está presente ou não.

Logo que o ADN introduzido tenha sido integrado no genoma da célula da planta, normalmente continua a ser estável ai e também permanece nos descendentes da célula originalmente transformada. A célula contém normalmente um marcador seleccionado qual transmite às células de plantas transformadas resistência contra um biocida ou antibiótico como kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin ou phosphinotricin, entre outros. Os marcadores seleccionados individualmente devem por isso permitir uma selecção das células transformadas contra as células que não têm o ADN introduzido.

As células transformadas crescem da forma usual dentro da planta (ver também McCormick *et al.*, Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). As plantas resultantes podem ser postas em cultura de forma usual e serem cruzadas com plantas que têm a mesma herança genética transformada ou outra herança genética. Os indivíduos híbridos resultantes têm as propriedades fenotípicas correspondentes.

Devem crescer duas ou mais gerações para assegurar que a característica fenotípica é conservada de forma estável e que é transferida. Além disso, devem colher-se sementes de modo a assegurar que o fenótipo correspondente ou outras propriedades permanecerão.

Devido às suas propriedades, o amido obtido das células das plantas ou das plantas da presente invenção não só é apropriado para os fins específicos já mencionados antes, mais também para várias utilizações industriais.

Em princípio, o amido pode ser subdividido em dois campos principais. Os produtos da hidrólise compreendem essencialmente glicose e componentes de glucanos obtidos por processos enzimáticos ou químicos, podendo ser utilizados para outros processos, tal como a fermentação ou modificações químicas. Neste contexto, pode ser importante que o processo de hidrólise pode ser realizado de uma forma simples e barata, normalmente, realizando-se praticamente de uma forma enzimática utilizando amiloglicosidase. É provável que os custos possam ser reduzidos utilizando quantidades menores de enzimas para hidrólise devido às alterações na estrutura do amido, por exemplo, aumentando a superfície do grão, melhorando a possibilidade de digerir devido a uma estrutura menos ramificada ou esférica do grão, o que limita a acessibilidade para as enzimas utilizadas.

A utilização do chamado amido natural que se utiliza por causa da sua estrutura polimérica, pode ser subdividida em mais duas áreas:

(a) <u>Utilização em comestíveis</u>

O amido é um aditivo clássico para vários comestíveis, em que serve essencialmente a finalidade de ligação dos aditivos aquosos e/ou causa uma viscosidade aumentada ou uma formação de gel aumentada. As propriedades importantes características são o comportamento de fluidez e de absorção, o aumento de volume e a temperatura de pastificação, viscosidade e desempenho do espaçamento, solubilidade do amido, transferência e estrutura da pasta, calor, corte e

resistência a sais ácidos, tendências para retrogradação, capacidade de formação de filmes, resistência à congelação/descongelação, capacidade de ser digerível, assim como capacidade de formação de complexos com, por exemplo, iões inorgânicos ou orgânicos.

(b) <u>Utilização em não comestíveis</u>

O outro campo principal de aplicação é a utilização do amido como um adjuvante em vários processos de produção ou como um aditivo em produtos técnicos. Os principais campos de aplicação para se utilizar o amido como adjuvante são, primeiro que tido, a industria do papel e do cartão. Neste domínio, o amido é principalmente utilizado para retenção (segurar os sólidos), para o dimensionamento das cargas e das partículas finas, como uma substância de solidificação e para a desidratação. Além disso, as propriedades vantajosas do amido, no que respeita à dureza, som, força, brilho, maciez, força de lágrima, assim como o uso que se faz das superfícies.

Dentro do processo para a produção do papel, pode-se fazer uma diferenciação entre quatro campos de aplicação, nomeadamente superfície, revestimento, massa e pulverização.

Os requisitos do amido no que respeita ao tratamento da superfície são essencialmente um elevado grau de brilho, a viscosidade correspondente, a estabilidade a alta viscosidade, uma boa formação de filme, assim como uma baixa formação de pó. Quando no revestimento, o teor de sólido, a viscosidade correspondente, a elevada capacidade para se

ligar assim como uma elevada afinidade para pigmentos desempenham um papel importante. Como aditivo para a massa, a rapidez, uniformidade, dispersão isenta de perdas, elevada estabilidade mecânica e completa retenção na pasta de papel são de importância. Quando se utiliza o amido na pulverização, o teor de sólidos correspondente, a elevada viscosidade, assim como uma elevada capacidade de ligação são também significativas. Um domínio principal de aplicação é, por exemplo, na indústria dos adesivos, em que os campos de aplicação se subdividem em quatro áreas: a utilização como cola de amido puro, a utilização em colas de amido preparadas com produtos químicos especiais, a utilização do amido como um aditivo das resinas sintéticas e das dispersões de polímeros, assim como a utilização de amidos como extensores dos adesivos sintéticos. 90% dos adesivos à base de amido dão utilizados na produção de cartão canelado, sacos de papel, materiais compósitos para papel e alumínio, caixas e cola molhável para envelopes, selos, etc.

Uma outra utilização possível como adjuvante e aditivo é na produção de têxteis e produtos para tratar os têxteis. Dentro da indústria têxtil, pode-se fazer uma diferenciação entre os quatro campos de aplicação seguintes: a utilização de amido como um agente de dimensionamento, isto é, como um adjuvante para o amaciamento e o reforço do comportamento das brocas para a protecção contra forças tênseis activas na tecelagem, assim como para aumentar a resistência ao atrito durante a tecelagem, como um agente para a melhoria dos têxteis principalmente depois dos pré-tratamentos de qualidade-deterioração, tal como o lixiviamento, coloração etc., como

espessantes na produção de pastas de corantes para a prevenção da difusão de corante e como um aditivo para agentes de deformação para fios de costura.

Além disso, o amido pode ser utilizado como um aditivo em materiais de construção. Um exemplo é a produção de quadros de gesso e giz, em que o amido misturado no gesso fino plastifica com a água, difunde-se na superfície do quadro de gesso e assim liga-se ao cartão do quadro. Outros campos de aplicação são a mistura do amido ao gesso e fibras minerais. Em cimento pronto para utilizar, o amido pode ser utilizado para a desaceleração do processo de dimensionamento.

Além disso, o amido é vantajoso para a produção de meios para a estabilização dos selos utilizados para a protecção temporária de partículas de selo contra a água em troca de terra artificial. De acordo com o conhecimento do estado da técnica, os produtos de combinação consistiam em amido e emulsões de polímeros podem ser considerados como tendo efeito de erosão e de incrustação como os produtos utilizados até aqui; contudo, eles são consideravelmente mais baratos.

Outro domínio de aplicação é a utilização do amido em protectores de plantas para a modificação das propriedades específicas destas preparações. Por exemplo, os amidos utilizam-se para melhorar a molhagem de protectores de plantas e fertilizantes, para a libertação doseada dos ingredientes activos, para a conversão de ingredientes activos líquidos, voláteis e/ou cheirosos em substâncias microcristalinas, estáveis, deformáveis, para a mistura de

composições incompatíveis e para o prolongamento da duração do efeito devido a uma desintegração reduzida.

Domínios importantes de aplicação são os domínios dos fármacos, da medicina e da indústria dos cosméticos. Na indústria farmacêutica, o amido pode ser utilizado como um ligante para comprimidos ou para a diluição do ligante em cápsulas. Além disso, o amido é apropriado como desintegrante para comprimidos, dado que, após aumentar de volume, absorve fluido e, depois de um curto espaço de tempo, aumenta tanto de volume que o ingrediente activo é libertado. Por razões qualitativas, os fluxos medicinais e os pós são outros domínios de aplicação. No domínio dos cosméticos, o amido pode, por exemplo, ser utilizado como um veículo de aditivos em pó, tal como essências e ácido salicílico. Um campo relativamente extenso de aplicação do amido é a pasta de dentes.

É possível a utilização do amido como um aditivo para o carvão e os briquetes. Adicionando amido, o carvão pode ser quantitativamente aglomerado e/ou transformado em briquetes de alta qualidade, prevenindo assim a desintegração prematura das briquetes. O carvão para churrasco contém entre 4 e 6% de amido adicionado, o carvão calorífero tem entre 0,1% e 0,5%. Além disso, o amido é apropriado como um agente de ligação, dado que a sua adição e a briquetes pode reduzir consideravelmente a emissão de substâncias tóxicas.

Além disso, o amido pode ser utilizado como um floculante no tratamento de minério e pasta de carvão.

Um outro campo de aplicação é a utilização de um aditivo para tratar materiais de fundição. Para vários processos de fundição, são necessários núcleos produzidos a partir de areias misturadas com agentes de ligação. Hoje em dia, o agente de ligação mais frequentemente utilizado é a bentonite misturada com amidos modificados, a maior parte, amidos que aumentam de volume. A finalidade da adição de amido é aumentar a resistência do fluxo assim como melhorar a força de ligação. Além disso, os amidos que aumentam de volume podem cumprir todos os pré-requisitos para o processo de preparação, tal como dispersibilidade em água fria, rehidratisabilidade, boa capacidade de se misturar com a areia e uma elevada capacidade de se ligar com água.

Na indústria da borracha, pode-se utilizar amido para melhorar a qualidade técnica e óptica. As razões para isto são a melhoria do brilho da superfície, a resistência e a aparência. Com esta finalidade, dispersa-se o amido nas superfícies aborrachadas pegajosas das substâncias de borracha antes da vulcanização a frio. Também pode ser utilizado para melhorar a capacidade de imprimir na borracha.

Um outro domínio de aplicação para o amido modificado é a produção de substitutos de couro.

No mercado do plástico, estão a emergir os seguintes campos de aplicação: a integração de produtos derivados de amido no processo de transformação do amido é apenas uma carga, não há uma ligação directa entre o polímero sintético e o amidol ou,

alternativamente, a integração de produtos derivados de amido na produção de polímeros (amido e polímero formam uma ligação estável).

A utilização do amido como uma carga pura não pode concorrer com outras substâncias tal como o talco. Esta situação é diferente quando as propriedades específicas do amido se tornam efectivas e o perfil de propriedade dos produtos finais está assim claramente alterada. Um exemplo é a utilização de produtos de amido na transformação de materiais termoplásticos, tal como polietileno. Aqui, o amido e o polímero sintético estão combinados numa relação de 1:1 por meio da co-expressão para formar um "lote mestre", a partir do qual se produzem vários produtos por meio de técnicas comuns utilizando polietileno granulado. A integração de amido nos filmes de polietileno pode causar uma permeabilidade acrescida das substâncias em corpos ocos, uma permeabilidade ao vapor de água melhorada, comportamento anti-estático melhorado, comportamento anti-bloco melhorado, assim como uma capacidade de ser impressa melhorada com corantes aquosos.

Outra possibilidade é a utilização de amido em espumas de poliuretano. Devido à adaptação dos derivados de amido, assim como devido à optimização das técnicas de transformação, é possível controlar especificamente a reacção entre polímeros sintéticos e os grupos hidroxi do amido. Os resultados são filmes de poliuretano com os perfis de propriedades que se seguem devido à utilização do amido: um coeficiente reduzido de expansão térmica, uma diminuição do comportamento de

enrugamento, uma melhoria do comportamento da pressão/tensão, um aumento da permeabilidade do vapor de águia sem uma alteração na absorção de água, redução da inflamabilidade e densidade de craqueamento, sem derrames de partes do combustível sem halogenetos e uma redução do envelhecimento. O desenvolvimento do produto do filme não é a única opção.

Também produtos plásticos sólidos, tal como potes, pratos e tigelas, podem ser produzidos por meio de um teor de amido de mais do que 50%. Além disso, as misturas de amido/polímero oferecem a vantagem de serem mais facilmente biodegradáveis.

Além disso, devido à sua extrema capacidade de se ligar à água, os polímeros de enxerto de amido ganharam uma enorme importância. Trata-se de produtos que têm uma estrutura de amido e um gradeamento de um monómero sintético enxertado de acordo com o princípio do mecanismo de cadeia lateral. Os polímeros de enxerto de amido disponíveis hoje em dia são caracterizados por uma ligação melhorada e a capacidade de retenção até 1000 g de água por g de amido a uma elevada viscosidade. Estes super-absorventes são utilizados principalmente no domínio da higiene, por exemplo, em produtos tais como guardanapos e toalhas, assim como no sector da agricultura, por exemplo em grânulos de sementes.

Os factores decisivos para a utilização do novo amido modificado pelos processos da tecnologia de genes são, por outro lado, a estrutura, o teor de água, o teor de proteína, o teor de lípido, o teor de fibra, o teor de cinzas/fosfato, a relação de amilose/amilopectina, a distribuição da massa

molar relativa, o grau da ramificação, a dimensão e a forma dos grânulos, assim como a cristalização e, por outro lado, as propriedades que resultam nas características seguintes: comportamento de fluxo e da absorção, temperatura de pastificação, viscosidade, desempenho do espessamento, solubilidade, estrutura da pasta, transparência, calor, corte e resistência ao ácido, tendência para retrogradação, capacidade de formação de gel, resistência à congelação/descongelação, capacidade de formação de complexos, ligação ao iodo, formação de filmes, força adesiva, estabilidade da enzima, digestibilidade e reactividade. A característica mais marcante é a viscosidade.

Além disso, o amido modificado obtido das células descritas das plantas ou das plantas pode ser submetido a outras modificações químicas, o que resultará noutra melhoria da qualidade de certos campos de aplicação descritos antes ou em campos de aplicação. Estas modificações químicas são conhecidas principalmente dos especialistas na matéria. Em particular trata-se de modificações por meio de

- Tratamento com ácido
- Oxidação e
- esterificação (formação de amidos de fosfato, nitrato, sulfato, xantato, acetato e citrato; também se podem utilizar outros ácidos orgânicos para a esterificação)
- formação de éteres de amido (éter de alquilo e amido, éter de O-alilo, éter de hidroxialquilo, éter de O-carbocilmetilo, éteres de amido contendo N, éteres de amido contendo S)

- Formação de amidos ramificados
- Formação de polímeros enxertados em amido

Os plasmídeos produzidos e/ou utilizados dentro do significado da presente invenção, têm sido depositados no depósito conhecido internacionalmente "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)" em Braunschweig, República Federal da Alemanha, de acordo com os requisitos do tratado de Budapeste para o reconhecimento internacional de depósitos de microrganismos para serem patenteados

(número de depósito; data de depósito):

Plasmídeo	pBinAR Hig	(DSM 9505)	(20.10.1994)
Plasmídeo	p33-anti-BE	(DSM 6146)	(20.08.1990)
Plasmídeo	pRL2	(DSM 10225)	(04.09.1995)~

Meios e soluções utilizados

Tampão de eluição	25	mM	Tris pH 8,3
	250	mM	Glicina
Tampão de diálise	50	mM	Tris-HCl pH 7,0
	50	mM	NaCl
	2	mM	EDTA
	14,7	mM	β-Mercaptoetanol
	0,5	mM	PMSF
Tampão de proteína	50	mM	Tampão de fosfato de sódio pH 7,2
	10	mM	EDTA
	0,5	mM	PMSF
	14,7	mM	β-Mercaptoetanol
Solução de lugol	12	g	Kl
	6	g	l_2

ad 1,8l com ddH_2O

20 x SSC 175,3 g NaCl

88,2 g de nitrato de sódio

ad 1000 ml com ddH_2O

pH 7,0 com 10 N NaOH

10 x MEN 200 mM MOPS

50 mM acetato de sódio

10 mM EDTA

pH 7,0

Tampão NSEB 0,25 M tampão fosfato de sódio pH7,2

7% SDS

1 mM EDTA

1% BSA (p/v)

Descrição das figuras

A **Fig.1** mostra o plasmídeo p35S-anti-RL.

Estrutura do plasmídeo:

A = Fragmento A: promotor 35S, nucleótidos 6909 a 7437 do VCMf (Franck *et al*, Cell 21 (1980), 285-294)

B = Fragmento B: fragmento Asp718 de pRL1 com um comprimento aproximado de 1949 bp

Orientação como para o promotor: sentido inverso

A seta indica a direcção do fragmento de leitura aberta.

C = fragmento C: nt 11748-11939 do ADN-T do plasmídeo Ti pTiACH5 (Gielen *et al*., EMBO J. 3 (1984), 835-846)

A **Fig. 2** mostra o plasmídeo p35S-anti-RL.

Estrutura do plasmídeo:

A = Fragmento A: promotor B33, do gene B33 de patatina a partir de *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa *et al.*, EMBO J. 8 (1989), 23-29)
B = Fragmento B: fragmento Asp718 de pRL1 com um comprimento aproximado de 1949 bp
Orientação como para o promotor: sentido inverso
A seta indica a direcção do fragmento de leitura aberta.
C = fragmento C: nt 11748-11939 do ADN-T do plasmídeo Ti pTiACH5 (Gielen *et al.*, EMBO J. 3 (1984), 835-846)

A Fig. 3 mostra uma curva de Barbender de uma solução aquosa de amido, registada com um viscógrafo do tipo Viskograph da Brabender, que foi isolada de plantas de batata não transformadas da variedade Désirée (ver também o exemplo 8).

Significando: Drehm. Torque

[BE]	Unidades de Brabender
Temp.	Temperatura
A	Início da pastificação
B	Viscosidade máxima
C	Início do tempo de manutenção
D	Início do tempo de arrefecimento
E	Fim do tempo de arrefecimento
F	Fim do tempo de manutenção

A linha azul indica a viscosidade; a linha vermelha representa a temperatura.

A Fig. 4 mostra uma curva de Barbender de uma solução aquosa de amido, registada com um viscógrafo do tipo Viskograph-E da

Brabender, que foi isolada de plantas de batata transformadas com o plasmídeo p35S-anti-RL (ver também Exemplo 8). Quanto ao significado das abreviaturas, ver figura 3.

A Fig. 5 mostra uma curva de Barbender de uma solução aquosa de amido da batata transformada com o plasmídeo p35S-anti-RL (ver também Exemplo 8), registada com um viscógrafo do tipo Viskograph-E da Brabender. Quanto ao significado das abreviaturas, ver figura 3.

A fig. 6 mostra as curvas de soluções aquosas de amido isolado de plantas de batata (ver também exemplo 12), que foram registadas com um analisador rápido de viscosidade. A linha vermelha corresponde à temperatura; as linhas azuis 1, 2, 3 e 4 mostram as viscosidades das soluções de amido que se seguem:

Linha 1: Amido isolado de plantas de tipo selvagem
Linha 2: Amido isolado de plantas em que a enzima da ramificação foi inibida separadamente (ver o exemplo 1 do pedido de patente de invenção WO/14827),
Linha 3: Amido isolado de plantas em que somente a concentração das proteínas da presente invenção tinha sido reduzida (ver exemplo 6),
Linha 4: Amido isolado de plantas que tinham sido transformadas com o plasmídeo p35S-anti-RL em combinação com o plasmídeo p35SH-anti BE (ver exemplo 12).

A **fig. 7** mostra as curvas de soluções aquosas de amido isolado de plantas de batata (ver também exemplo 13), que

foram registadas com um analisador rápido de viscosidade. A linha vermelha corresponde à temperatura; as linhas azuis 1, 2, 3 e 4 mostram as viscosidades das soluções de amido que se seguem:

Linha 1: Amido isolado de plantas de tipo selvagem
Linha 2: Amido isolado de plantas que tinham sido transformadas separadamente com o plasmídeo pB33-anti-GBSSI (chamada batata cerosa),
Linha 3: Amido isolado de plantas que tinham sido transformadas separadamente com o plasmídeo p35S-anti-RL (ver exemplo 6),
Linha 4: Amido isolado de plantas que tinham sido transformadas com o plasmídeo pB33-anti-GBSSI (ver exemplo 13).

A Fig. 8 mostra o plasmídeo pRL2 que compreende um ADNc de comprimento completo de batata que codifica uma enzima R1.

Os exemplos ilustram a presente invenção.

Nos exemplos, utilizara-me as seguintes técnicas normalizadas.

1. Clonagem

Para a clonagem da E. coli utilizou-se o vector pBluescriptSK.

Para a transformação da planta, clonaram-se as estruturas do gene no vector binário pBinAR (Hofgen e Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990), 221-230) e B33-Hig.

2. Estirpes bacterianas

Para o vector Bluescript e para a estrutura pBinAR e B33-Hig, utilizou-se a estirpe de E. coli DH5α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, EUA)

A transformação dos plasmídeos das plantas de batata foi realizada por meio da estirpe C58Cl pGV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* (Deblaere *et al.*, Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777:4788).

3. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

A transferência do ADN foi realizada por meio da transformação directa de acordo com o processo de transformação de Hofgen & Willmitzer (Nucleic Acids Res. 16 (1988), 9877). O ADN do plasmídeo da Agrobacteria transformada foi isolado de acordo com o processo da Birnboim & Doli (Nucleic Acids Res. 7 (1979), 1513-1523) e analisado por electroforese depois da clivagem de restrição apropriada.

4. Transformação de batatas

Trataram-se dez folhas pequenas de uma cultura de batata esterilizada (Solanum Tuberosum L.cv. Desiree) cortadas por um cortante, com 10 mL de meio MS (Murashige & Skoog, Physiol. Plant. 15 (1962), 473-497) com sacarose a 2%. O meio continha 50 µL de uma cultura de *Agrobacterium tumefaciens* que cresceu durante a noite sob selecção.

Depois de agitar ligeiramente durante 3-5 minutos, fez-se mais uma incubação no escuro durante dois dias. As folhas foram em seguida postas num meio MS com glicose a 1,6%, 5mg/L de ácido acético de naftilo, 0,2 mg/L de benzilaminopurina, 250 mg/L de claferano, 50mg/L de canamicina ou 1 mg/L de higromicina B e Bacto Agar a 0,80 % para a indução de calos. Passada uma semana de incubação a 25°c e 3000lux, colocaram-se as folhas em meio MS com glicose a 1,6 %, 1,4 mg/L de zeatina ribose, 20 mg/L de ácido acético e de naftilo, 10 mg/L de ácido giberélico, 250 mg/L de claforano, 50mg/L de canamicina ou 3 mg/L de higromicina B e Bacto Agar a 0,80 % para a indução de rebentos.

5. Marcação radioactiva de fragmentos de ADN

A marcação radioactiva dos fragmentos de ADN foi realizada por meio de um kit de marcação aleatória de iniciadores de ADN da Boehringer (Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

6. Análise de mancha de Northern

Isolou-se o ARN do tecido das folhas das plantas de acordo com protocolos padrão. Separou-se 50 µg do ARN num gel de agarode (Agarose a 1,5%, 1 X MEN de tampão, formaldeído a 16,6 %). Depois da passagem pelo gel, lavou-se rapidamente o gel em água. Transferiu-se o ARN para uma membrana de nylon do tipo N da Hybond (Amersham, RU) com 20x SSC por meio de uma mancha capilar. A membrana foi em seguida levada a um forno em vácuo durante duas horas a 80 °C. A membrana foi pré-hibridizada em tampão de NSEB durante duas horas a 68 °C

e em seguida hibridizou-se durante a noite em tampão NSEB na presença da sonda marcada radioactivamente a 68 °C.

7. Manutenção da planta

Mantiveram-se as plantas de batata na estufa nas seguintes condições

Período de luz	16 horas a 25000 lux e 22 °C
Período de escuridão	8 horas a 15 °C
Humidade atmosférica	60%

8. Determinação da relação amilose/amilopectina no amido obtido das plantas da batata

Isolou-se o amido das plantas de acordo com processos padrão e determinou-se a relação amilose/amilopectina de acordo com o processo descrito por Hovenkamp-Hermelink et al. (Potato Research 31 (1988) 241-246).

9. Determinação da glicose, frutose e sacarose

Para determinar o teor de glicose, frutose e/ou sacarose, congelaram-se pequenos bocados de tubérculos de batata (com um diâmetro de aprox. 10 mm) em azoto líquido e em seguida extraiu-se durante 30 min a 80 °C no seio de 0,5 mL de HRPES 10 mM, a pH 7,5; etanol a 80% (vol/vol). Retirou-se o sobrenadante contendo os componentes solúveis e determinou-se o volume. Utilizou-se o sobrenadante para a determinação da quantidade de açúcares solúveis. A determinação quantitativa de glicose, frutose e sacarose solúveis realiza-se no seio de uma mistura reaccional com a seguinte composição:

100,0	mM	Imidazol/HCl, pH 6,9
1,5	mM	$MgCl_2$
0,5	mM	$NADP^+$
1,3	mM	ATP
10-50	µl	Amostra
1,0	U	Glicose-6-fosfato desidrogenase a partir de levedura

Incubou-se a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 5 minutos. A determinação de açúcares subsequente realiza-se por meio de processos fotométricos normalizados, medindo a absorção a 340 nm, depois da adição sucessiva de

1,0	Unidades	Hexocinase a partir de levedura (para a determinação de glicose)
1,0	Unidades	Fosfogliccisomerase a partir de levedura (para a determinação de frutose)

e

1,0	Unidades	invertase a partir de levedura (para a determinação de sacarose)

Exemplo 1

Isolamento das proteínas ligadas e grânulos de amido originário em amido de batata

O isolamento das proteínas ligadas a grânulos de amido originário em amido de batata tem sido realizado por meio de electroeluição numa aplicação da eluição que se construiu em analogia com o "Model 422 Electro-Eluter" (BIORAD Laboratories Inc., EUA) mas tem um volume consideravelmente maior (aprox. 200 mL). Dissolveu-se 25g de amido anidro num

tampão de eluição (volume final de 80 mL). O amido derivou de batatas que produzem um amido quase isento de amilase devido à expressão em sentido inverso de uma sequência de ADN que codifica a sintaxe de amido ligado a grânulos de amido I (SALGA I) da batata. Aqueceu-se a suspensão a 70-80 °C num banho de água. Em seguida, adicionou-se 72,07g de ureia (concentração final de 8M) e completou-se o volume para 180 mL com um tampão de eluição. Dissolveu-se o amido com uma agitação permanente e obteve-se uma consistência semelhante a uma pasta. Eluiram-se as proteínas por electroeluição à solução da noite por meio de um aparelho de eluição (100V; 50-60 mA). As proteínas eluídas foram cuidadosamente retiradas do aparelho. Eliminaram-se as partículas em suspensão com uma centrifugação curta. Fez-se a diálise do sobrenadante a 4 °C, 2 a 3 vazes durante uma hora, com um tampão de diálise. Em seguida, determinou-se o volume de solução de proteína. As proteínas precipitaram por meio da adição de sulfato de amónio (concentração final de 90%), o que foi feito com agitação permanente, a 0 °C. As proteínas precipitaram e foram amalgamadas por centrifugação e foram novamente suspensas no seio de um tampão de proteínas.

Exemplo 2

Identificação e isolamento de sequências de ADNc que codificam as proteínas ligadas a grânulos de amido

As proteínas isoladas, de acordo com o exemplo 1, foram utilizadas para a produção de anticorpos policlonais de coelho, que reconhecem especificamente as proteínas ligadas a grânulos de amido. Por meio desses anticorpos, analisou-se em seguida uma biblioteca de expressão de ADNc no que respeita

as sequências se codificação de proteínas ligadas a grânulos de amido, utilizando processos padrão.

A biblioteca de expressão produziu-se como se segue: Isolou-se poli(A^+)-ARNm a partir de tubérculos de batata de variedade "berolina" de acordo com processos padrão. Partindo da poli(A^+)-ARNm, produziu-se ANc de acordo com o processo de Gubler e Hoffmann (Gene 25 (1983), 263-269), utilizando um iniciador de Oligo $d(t)_{18}$ *Xho* I. Cortou-se este ADNc com *Xho* I depois da adição do ligante *EcoR* I e ligou-se de uma forma orientada num vector lambda ZAP II (Stratagene) e cortou-se com *EcoR* I e *Xho* I. avaliaram-se aproximadamente 500.000 placas de uma biblioteca de ADNc construída dessa forma, para determinar que sequências eram reconhecidas pelos anticorpos policlonais dirigidos contra as proteínas ligadas a grânulos de amido.

Para analisar as placas de fago, transferiram-se estas para filtros de nitrocelulose que tinham sido previamente incubados numa solução de IPTG 10 mM, durante 30 a 60 minutos e secaram-se em seguida em papel de filtro. A transferência deu-se a 37 °C durante 3 horas. Em seguida, incubaram-se os filtros à temperatura ambiente durante 30 minutos num bloco de reagente com os anticorpos policlonais dirigidos contra proteínas ligadas a grânulos de amido, e foram lavados duas vezes por 5-10 minutos em tampão TBST. O filtrado foi agitado com os anticorpos policlonais contra a proteína ligada ao grão de amido, no seio de uma diluição apropriada durante uma hora à temperatura ambiente ou durante 16 horas a 4 °C. A identificação das placas que expressam uma proteína que foi

reconhecida pelos anticorpos policlonais por meio do "Kit de detecção de manchas para os anticorpos de ratos RPN23" (Amersham RU), de acordo com as instruções do fabricante.

Os clones do fago da biblioteca do ADNc que expressam uma proteína que era reconhecida pelos anticorpos policlonais foram ainda purificados pela utilização de processos padrão.

Por meio do método de excisão *in vivo*, obtiveram-se clones de *E. coli* a partir de clones de fagos positivos contendo um plasmídeo pBluescript coma inserção de ADNc correspondente. Depois de se verificar a dimensão e o modelo de restrição das inserções, analisou-se ainda um clone apropriado pRL1.

Exemplo 3

Análise de sequências da inserção de ADNc do plasmídeo pRL1

Isolou-se o plasmídeo pRL1 a partir de um clone de *E. coli* obtido de acordo com o exemplo 2 e determinou-se uma parte da sequência da sua inserção de ADNc por processos normalizados utilizando o processo do didesoxinucleótido (Sanger *et al.*, Proc. Natl, Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467). A inserção tem um comprimento de cerca de 2450 pb. Uma parte da sequência de nucleótido, assim como a sequência de aminoácidos derivada dela, são indicadas por Sed. ID n° 3 e por Seq. ID n° 4. Uma análise das sequências e uma comparação das sequências com sequências de ADN conhecidas mostraram a sequência indicada Seq. ID n° 3 é nova e não exibe homologia significativa com as sequências de ADN conhecidas até agora. Além disso, a análise das sequências mostrou que a inserção

de ADNc é apenas um ADNc parcial em que falta uma parte da região de codificação na extremidade 5'.

Exemplo 4

Identificação e isolamento de um ADNc de codificação de uma proteína ligada a grânulos de amido a partir de *Solarum Tuberosum*

Para isolar um ADNc completo, correspondendo à inserção parcial de ADNc do plasmídeo pRL1, produziu-se mais uma biblioteca de ADNc. Trata-se de uma biblioteca de ADNc *Solarum Tuberosum*, que se construiu como se segue:

Primeiro, produziram-se fragmentos de epiderme de folhas de plantas de batata da variedade "Desirée", praticamente de acordo com o processo de Hedrich *et al* (Plant Phisiol. 89 (1989), 148), colhendo aproximadamente 60 folhas de plantas de batatas de seis semanas mantidas em estufa. Retirou-se a nervura central das folhas, em seguida, moeram-se as folhas num grande "misturador da Waring" (com um volume de 1 litro) quatro vezes, em H_2O destilada arrefecida, no seu nível mais elevado, durante 15 segundos de cada vez. Filtrou-se a suspensão através de um peneiro de nylon com uma dimensão de poros de 220 µm (Nibolt, Zurique, Suíça) e lavou-se várias vezes em água destilada fria. Filtrou-se a própria suspensão através de um peneiro de nylon com uma dimensão de poros de 220 µm e lavou-se intensamente com água destilada fria. Os fragmentos de epiderme (resíduos) foram examinados num pequeno "misturador da Waring" (volume 250 mL) e reduzidos em águas destilada e gelo, por quatro vezes por 15 segundos de cada vez. Filtrou-se a suspensão através de um peneiro de

nylon com uma dimensão de poros de 220 µm e lavou-se várias vezes em água destilada fria. Os fragmentos de epiderme (resíduos) foram examinados ao microscópio para avaliar a contaminação por células de mesofilo. Quando ocorre contaminação, repete-se a etapa de moagem num pequeno "misturador da Waring".

O rompimento das células de guarda dos fragmentos da epiderme foi realizado por meio da pulverização em azoto líquido num almofariz arrefecido durante aproximadamente 2 horas. Para examinar o rompimento das células da guarda, recolheram-se regularmente amostras e examinaram-se ao miocroscópio. Passadas 2 horas, ou quando uma quantidade suficientemente alta de células de guarda se tinha rompido, encheu-se um tubo de reacção com o pó que se obteve (com um volume de 50 mL) e fez-se uma nova suspensão num volume de tampão de GTC (Chirgwin *et al.*, Biochem. 18 (1979), 5294-5299). Centrifugou-se a suspensão e filtrou-se o sobrenadante através de um Miracloth (Calbiochem, La Jolla, Calif.). Submeteu-se o filtrado a ultracentrifugação durante 16 horas, tal como descrito em Glisin *et al* (Biochemistry 13 (1974), 2633-2637) e Mornex *et al*. (J. Clin. Invés. 77 (1986), 1952-1961). Depois da centrifugação, dissolveu-se o precipitado de ARN no seio de 250 µl de tampão de GTC. O RNA foi precipitado através de 0,05 volume 1M de ácido acético e 0,7 de volume de etanol. O ARN precipitou por centrifugação e lavou-se o precipitado com acetato de sódio 3M (pH 4,8) e etanol a 70%. Secou-se rapidamente o ARN e dissolveu-se em água tratada com DEPC. Isolou-se o ARN de poli A^+ a partir de ARN isolado, de acordo com processos padrão. Partindo do ARNm de poli(A^+),

produziu-se o ADNc de caordo com o processo de Gubler e Hoffmann (Gene 25 (1983), 263-269) por meio do iniciador de oligo $d(t)_{18}$ de *Xho* I. Este ADNc foi cortado com *Xho* I depois da adição do ligante *EcoR* i e ligou-se de uma forma orientada num vector lambda ZAP II (Stratagene GmbH, Heidelberg, Alemanha) e cortou-se com *EcoR* I e *Xho* I. O empacotamento nas cabeças dos fagos realizou-se o kit dourado da Gigapack II kit (Stratagene GmbH, Heidelberg, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

A partir de uma biblioteca de ADNc, isolaram-se os clones de fagos hibridizaram com a inserção de ADNc do plasmídeo pRL1 e purificaram-se de acordo com processos padrão. Por meio da excisão *in vivo*, obtiveram-se clones de *E. Coli* a partir de clones positivos de fagos contendo um plasmídeo pBluescript de estrutura helicoidal dupla, com a correspondente inserção de ADNc. Depois de se verificar a dimensão e o modelo de restrição das inserções, submeteram-se os clones apropriados a um mapeamento de restrição e a uma análise da sequência. A partir de um clone apropriado, isolou-se o plasmídeo pRL2 (DSM 10225) que contém um ADNc completo que codifica uma proteína ligada a grânulos de amido de batata.

Exemplo 5

Análise da sequência da inserção de ADNc do plasmídeo pRL2

A sequência de nucleótido da inserção de ADNc do plasmídeo pRL2 foi determinada como se descreveu no exemplo 3. A inserção tinha um comprimento de 4856 pb. A sequência de nucleótidos, assim como a sequência de aminoácidos dela

derivada, está indicada na Seq. ID n° 1 e/ou Seq ID n° 2. A partir daqui, o gene correspondente será designado por gene RL.

Exemplo 6

A construção do plasmídeo P35S-anti-RL e a introdução do plasmídeo do genoma de plantas da batata

Por meio da endonuclease de restrição *Asp*718, isolou-se um fragmento de ADN com um comprimento aproximado de 1800 pb a partir do plasmídeo pRL1. Isto corresponde à sequência de ADN indicada pela Seq. ID n° 3 e contém uma parte do fragmento de leitura aberta. Ligou-se o fragmento no vector binário pBinAR cortado com *Asp*718 (Höfgen e Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990), 221-230). Trata-se de um derivado do vector binário pBin19 (Bevan, Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711-9721). O pBinAR foi construído como se segue.

Isolou-se um fragmento com um comprimento de 529 pb compreendendo os nucleótidos 6909-7437 do promotor de vírus de mosaico da couve-flor (Franck *et al.*, Cell 21 (1980), 285-294), a partir do plasmídeo pDH51 (Pietrzak *et al.*, Nucl. Acids Res. 14, 5857-5868) como um fragmento de *EcoR I/Kpn I* e ligou-se entre os sítios de *EcoR* I e *Kpn* I de poliligante pBin19. Isto conduziu ao plasmídeo pBin19-A.

Por meio da endonuclease de restrição *Pvu* II e *Hind* III, isolou-se um fragmento com um comprimento de 192 pb a partir do plasmídeo pAVG40 (Herrera-Estrella *et al.*, Nature 303, 209-213) compreendendo o sinal de poliadenilação do gene 3 do ADN-T do plasmídeo de Ti pTiACH5 (Gielen *et al*, EMBO J. 3,

835-846) (nucleótidos 11749-11939). Depois da adição do ligante de *Sph* I ao sítio *Pvu* I, ligou-se o fragmento de *Sph* I e os sítios *Hind* III de pBin19-A. Isto conduziu ao plasmídeo pBinAR.

Por meio das análises das sequências e de restrição, identificaram-se os vectores recombimantes em que se inseriu o fragmento de ADN no vector, de tal modo que um aparte da região de codificação de inserção de ADNc do pRL1 está ligada ao promotor 35S numa orientação de sentido inverso. O plasmídeo resultante está p35S-anti-RL está indicado na figura 1. Inserindo os fragmentos de ADNc, produz-se uma cassete de expressão que consiste nos fragmentos A,B e C:

O fragmento A (529 pb) contém o promotor 35S do vírus de mosaico da couve-flor (VMCf). O fragmento compreende os nucleótidos 6909 a 7437 do VCMf (Franck *et al*, Cell 21 (1980), 285-294).

Independentemente das regiões que o flanqueiam, o fragmento B contém uma parte da região que codifica a proteína da inserção de ADNc do plasmídeo pRL1. Isolou-se este como um fragmento de *Asp* 718 a partir de pRL1, tal como se descreveu antes e fundiu-se com o promotor 35S em pBinAR numa orientação antisense.

O fragmento C (192 pb) contém o sinal de poliadenilação do gene 3 do ADN-T do plasmídeo de Ti pTiACH5 (Gielen *et al*., EMBO J. 3 (1984), 835-846).

O plasmídeo p35S-anit-RL tem uma dimensão aproximada de 12,8 kb. Transferiu-se o plasmídeo para plantas de batata por meio de uma transformação mediada por agrobactérias, tal como se descrevei antes. A partir das células transformadas, regeneraram-se plantas completas. Fez-se uma cultura das plantas transformadas em condições de estufa. Analisando o ARN total numa análise de mancha Northern no que respeita ao desaparecimento dos transcritos complementares ao ADNc, e avaliou-se o sucesso da modificação genética das plantas. Com este fim, isolou-se o ARN total a partir de folhas de plantas transformadas de acordo com processos padrão e, em seguida, separou-se por meio de electroforese num gel de agarose, transferiu-se para uma membrana de nylon e hibridizaram-se com uma sonda marcada radioactivamente tendo a sequência indicada pela designação Seq ID n° 1 ou uma parte dela. Na análise de mancha de Northern, em cerca de 5-10 % das plantas transformadas, a banda indicou que faltava o transcrito específico na Seq. ID n° 1. Utilizaram-se estas plantas para análise da qualidade do amido.

Exemplo 7

A construção do plasmídeo pB33-anti-RL e a introdução do plasmídeo no genoma das plantas de batata

Por meio de endonuclease de restrição *Asp*718, isolou-se um fragmento de ADN com um comprimento aproximado de 1800 pb, que compreende um aparte do fragmento de leitura aberta da inserção de ADNc isolada do plasmídeo pRL1 e ligou-se no vector B33-Hyg que foi cortado com Asp718. Construiu-se este vector como se segue: eliminou-se o promotor 35S do vector pBinAr Hyg (DSM 9505) por meio da endonuclease de restrição

Ecor I e *Asp*718. Isolou-se um fragmento com um comprimento de cerca de 1526 pb, compreendendo o promotor B33 a partir do plasmídeo p33-anti-BE (DSM 6146) por meio de *EcoR* I e *Asp*718 e inseriu-se no vector pBinAr Hyg (DSM 9505) cortou-se com *Ecor* I e *Asp* 718. Inserindo o fragmento de ADNc num sítio de *Asp*718 do plasmídeo B33-Hyg, produz-se uma cassete de expressão que consiste nos fragmentos A, B e C, como se segue (Figura 4):

O fragmento A contém o promotor B33 de *Solanum tuberosum* (EP 3775 092; Rocha-Sosa *et al.*, EMBO J. 8 (1989), 23-29).

Independentemente das regiões que o flanqueiam, o fragmento B contém uma parte da região que codifica a proteína da inserção de ADNc do plasmídeo pRL1. Isolou-se este como um fragmento de *Asp* 718 a partir de PRL1, tal como se descreveu antes e fundiu-se com o promotor B33 em B33-Hyg, numa orinetação antisense.

O fragmento C (192 pb) contém o sinal de poliadenilação do gene 3 do ADN-T do plasmídeo de Ti pTiACH5 (Gielen *et al.*, EMBO J. 3 (1984), 835-846).

O plasmídeo pB35S-anti-RL tem uma dimensão aproximada de 12, 8kb.

Transferiu-se o plasmídeo para plantas de batata por meio de uma transformação mediada por agrobactérias, tal como se descrevem antes. A partir das células transformadas,

regeneraram-se plantas completas. Fez-se uma cultura das plantas transformadas em condições de estufa.

Analisando o ARN total numa análise de mancha de Northern no que respeita são desaparecimento dos transcritos complementares ao ADNc, e avaliou-se o sucesso da modificação genética das plantas. Com este fim, isolou-se o ARN total a partir de folhas de plantas transformadas de acordo com processos padrão e, em seguida separou-se por meio de electroforese num gel de agarose, transferiu-se para uma membrana de nylon e hibridizaram-se com uma sonda marcada radioactivamente tendo a sequência indicada pela designação Seq. ID nº 1 ou uma parte dela. Na análise de mancha de Northern, em cerca de 5-10% das plantas transformadas, a banda indicou que faltava o transcrito específico na Seq. ID nº 1. A partir destas plantas, isolou-se o amido dos tubérculos e analisou-se tal como se descreveu no exemplo 8.

Exemplo 8

Análise das plantas de batata transformadas

Examinaram-se as plantas transformadas de acordo com o exemplo 6 e o exemplo 7, no que respeita às propriedades do amido sintetizado. Realizaram-se as análises com várias linhas de plantas de batata que tinham sido transformadas com o plasmídeo p35S-anti-RL ou o plasmídeo pB33-anti-RL e em que, na análise de mancha de Northern não exibiram a banda indicando transcritos hibridizando com as sequências de ADN da presente invenção.

a) Determinação da viscosidade das soluções aquosas do amido

Para determinar a viscosidade das soluções aquosas do amido sintetizado nas plantas de batata transformadas, isolou-se o amido dos tubérculos das plantas que tinham sido transformadas com o plasmídeo p35S-anti-RL ou o plasmídeo pB33-anti-RL, utilizando processos padrão. Recolheu-se 30g de amido por cada 450 mL de H_2O e utilizou-se para análise num viscosímetro E (Brabender OHG) Duisburg (Alemanha)). Utilizou-se o aparelho de acordo com as instruções do fabricante. Para determinar a viscosidade da solução aquosa do amido, aqueceu-se primeiro a solução de amido de 50 °C a 96 °C a uma velocidade de 3 °C por minuto. Manteve-se em seguida a temperatura a 96 °C durante 30 minutos. Seguidamente, a solução foi arrefecida de 96 °C a 50 °C a uma velocidade de 3 °C por minuto. Durante todo o processo, determinou-se a viscosidade. Os resultados representativos nas figuras 3, 4 e 5, em que se mostra a viscosidade em função do tempo. A figura 3 mostra um gráfico típico de Brabender para amido isolado de plantas de tipo selvagem da variedade Désirée da batata. As Figuras 4 e 5 mostram um gráfico típico de Brabender para o amido isolado de plantas de batata que foram transformadas com o plasmídeo p35S-anti-RL ou pB33-anti-RL. A partir destes gráficos, podem-se deduzir diferentes valores característicos.

Os valores característicos para as plantas de tipo selvagem são os seguintes:

Quadro 1

Valor	**Tempo**	**Torque**	**Temperatura**
	[min : seg]	[BE]	[°C]
A	6:30	60,5±17,7	69,9±0,57
B	11:30	1838,0±161,2	86,0±2,1
C	15:15	1412,0±18,4	96,0
D	45:15	526,0±17,0	96,0
E	60:30	812,0±8,5	50,0
F	70:45	853,0±5,7	50,0

Os valores representam os valores médios obtidos de duas medições diferentes.

No quadro 1 e nos quadros 2 e 3 que se seguem, as abreviaturas têm os significados seguintes:

A Início da plastificação
B Viscosidade máxima
C Início do período de 96 °C
D Início do período de arrefecimento
E Fim de período de arrefecimento
F Fim do período final de 50 °C

Para plantas que tenham sido transformadas com o plasmídeo p35S-anti-RL (linha P2), os valores característicos são os seguintes:

Quadro 2

Valor	**Tempo**	**Torque**	**Temperatura**
	[min : seg]	[BE]	[°C]
A	6:00	50,0	69,0
B	14:00	820,0	93,0
C	15:15	815,0	96,0
D	45:15	680,0	96,0
E	60:30	1150,0	50,0
F	70:45	1200,0	50,0

Para plantas que tenham sido transformadas com plasmídeo pB33-anti-RL (linha P3) os valores característicos são os seguintes:

Quadro 3

Valor	**Tempo**	**Torque**	**Temperatura**
A	7:0	31,0	71,0
B	12:45	671,0	88,3
C	15:15	662,0	96,0
D	45:15	607,0	96,0
E	60:30	1063,0	50,0
F	70:45	1021,0	50,0

As figuras 3, 4 e 5 mostram claramente que o amido obtido das plantas transformadas difere do amido das plantas de tipo selvagem particularmente no facto de a viscosidade aumentar apenas muito ligeiramente durante o aquecimento. Assim, durante o aquecimento, a viscosidade máxima do amido das plantas transformadas é mais do que 50% inferior do que o caso do amido de tipo selvagem.

Durante o arrefecimento, por outro lado, a viscosidade do amido isolado das plantas transformadas aumenta mais do que no caso das plantas de tipo selvagem.

b) Determinação do teor de fosfato do amido

O teor de fosfato do amido determinou-se medindo a quantidade de fosfato ligado à posição de C-6 dos resíduos de glicose. Para este fim, primeiro degradou-se o amido por hidrólise ácida e determinou-se em seguida o teor de glicose-6-fosfato, por meio de um ensaio de enzima, tal como se descreve a seguir.

Fez-se a incubação de 100 mg de amido em 500 µL de HCl 0,7 N, durante 4 horas a 100 °C. Depois da hidrólise ácida, adicionou-se 10 µL da solução a 600 µL de tampão de imidazole (imidazole 100 mM, $MgOl_2$ 5 mM, a um pH de 6,9, NAD^+ 0,4 mM). Determinou-se a quantidade de glicose-6-fosfato na mistura reaccional por conversão com a glicose-6-fosfato-desidrogenase. Para este fim, adicionou-se a U de glicose-6-fosfato-desidrogenase (a partir de mesentacoides de Leuconostoc (Boehringer, Manheim)) a mistura reaccional e determinou-se a quantidade de NADH medindo a absorção a 340 nm. O teor de gtlicose-6-fosfato de 1 mg de amido está indicado no quadro seguinte para as plantas de batatas não transformadas da variedade Désirée, assim como para as duas linhas (P1 (35S-anti-RL); P2 (35S-anti-RL)) das plantas transgénicas de batata que tinham sido transformadas com o plasmídeo p35S-anti-RL.

Quadro 4

Plantas	**nmole de glicose-6-fosfato/mg de amido**	**%**
Tipo selvagem	12,89±1,34	100
P1(35S-anti-RL)	2,25±0,41	17,4
P2(35S-anti-RL)	1,25±0	9,7

O quadro que se segue mostra o teor de glicose-6-fosfato por miligrama de amido de batata em plantas de batata que foram transformadas com o plasmídeo pB33-anti-RL, comparado com o amido de plantas não transformadas (*S. Tuberosum*, c.v., Désirée).

Quadro 5

Plantas	**nmole de glicose-6-fosfato/mg de amido**	**%**
7	4,50±0,73	45,9
37	2,64±0,99	26,9
45	1,14±0,44	11,6
31	1,25±0,49	12,8

As plantas 7, 37, 45 e 31 representam transformantes independente que tinham sido transformados com o plasmídeo pB33-anti-RL. A planta 37 representa a linha P3 para a qual se desenha um gráfico Brabender na figura 5.

Os valores mostram que o teor de fosfato do amido modificado das plantas transgénicas de batata é pelo menos 50% inferior quando comparado com o amido das plantas de tipo selvagem.

c) Determinação do teor de glicose, frutose e sacarose dos tubérculos depois da armazenagem a 4 °C

Os tubérculos de plantas de várias linhas transgénicas que tinham sido transformadas com p35S-anti-RL de estrutura de sentido inverso, assim como tubérculos de plantas de tipo selvagem armazenadas a 4 °C ou respectivamente, a 20 °C na escuridão, durante 2 meses. Em seguida, determinam-se as quantidades de glicose, frutose e sacarose, tal como se descreveu antes. Para duas linhas transgénicas, os valores representativos obtidos foram os seguintes:

Quadro 6

	Glicose		**Frutose**		**Sacarose**	
Tipo selvagem	20°C	4°C	20°C	4°C	20°C.	4°C
cv Désirée	0,84	55,4	0,62	52,8	8,5	13,1
Transgénica Linha 15	1,12	6,7	0,75	7,8	7,5	1,0;1
Transgénica Linha 11	1,00	6,4	0,75	7,5	6,9	6,9

Os valores no quadro estão indicados em µmole de hexose ou sacarose/g de peso fresco.

Dos valores do quadro 6, torna-se óbvio que a acumulação dos açúcares redutores nos tubérculos é consideravelmente mais baixa nas plantas transgénicas armazenadas a 4 °C do que em plantas de tipo selvagem.

Considerando tudo, o amido modificado isolado das plantas transgénicas da batata parece-se com o amido das plantas de

milho do tipo selvagem. Contudo, em comparação, tem a vantagem de que o seu gosto é neutro e que por isso é mais apropriado para várias utilizações na área dos produtos comestíveis.

Exemplo 9

Expressão da inserção de ADNc do plasmídeo pRL2 em *E. coli*

(a) Transformação das células bacterianas

Para expressar a inserção de ADNc do plasmídeo pRL2, transformaram-se primeiro as células da estirpe DH5α de E. coli com o plasmídeo pACAC. Este plasmídeo contém um fragmento de ADN que codifica a ADP-glicose-pirofosforilase (AGpase) de E. coli, sob o controlo do promotor lac Z. O fragmento tinha sido isolado do vector PECA-15 como um fragmento de DraI/HaeII com uma dimensão de cerca de 1,7 kb (ver B. Müller-Rober (1992), dissertação, FU Berlim) e depois de se preencher nas suas extremidades pegajosas, tinha sido clonado num vector pACAC184 linearizado com HindIII. A expressão de AGPase causa um aumento de síntese do glicogénio nas células de E. coli transformadas. As células transformadas deste modo serão a seguir designadas por células de E.coli K1.

Para determinar a actividade da enzima da proteína codificada pelo ADNc do plasmídeo pRL2, transformaram-se as células de E. coli K1 com o plasmídeo pRL2. As células de E.coli transformadas que contêm o plasmídeo pACAC assim como o plasmídeo pRL2 serão a seguir designadas por células de E. coli k2.

A transferência do ADN do plasmídeo para as células bacterianas forma realizadas de acordo com o processo de Hanahan (J. Mol.Biol. 166 (1983), 557-580). As células de E.coli transformadas forma colocadas em placas de pratos de cultura de ágar com a seguinte composição:

Meio IT contendo:

1,5%	Bacto-Agar
50	mM Tampão de fosfato de sódio, pH 7,2
1%	Glicose
10 µg/ml	Cloranfenicol no caso das células de E. coli K1 ou
10 µg/ml	Cloranfenicol e
10 µg/ml	Ampicilina no caso das células de E. coli K2.

As células de E. coli da estirpe DH5 que tinham sido transformadas com o plasmídeo pRL2+pACAC (células de E. coli K2),bem como na forma de controlo com o plasmídeo pACAC (células de E.coli k1), cresceram nas placas de agar. O glicogénio formado das várias culturas foi examinado no que respeita ao grau de fosforilação (na posição C-6 da molécula de glicose), tal como se descreve a seguir.

(b) isolamento do glicogénio bacteriano

Para isolar o glicogénio bacteriano, a colónia de bactérias que tinham crescido depois da transformação flutuaram de cada uma das 6 placas de agar (Ø 135mm) com 5 mL de meio IT para cada placa. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 4500 xg durante 5 minutos. Voltou a suspender-se o precipitado bacteriano no seio de 10 mL de meio IT. O rompimento da

bactéria foi realizado por meio da adição de 2 volumes de meio de rompimento (NaOH 0,2 N; 1% de SDS) e por incubação à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Adicionando 3 volumes de EtOH abs., incubando a 4 °C durante 30 minutos e a centrifugação subsequente a 8000 xg durante 15 minutos, sedimentou o glicogénio. Depois, lavou-se o precipitado com 100mL de EtOH a 70% e sedimentou novamente por meio da etapa de centrifugação (10 minutos a 8000 xg). O processo de lavagem foi repetido 4 vezes.

(c) Determinação do teor total de glicogénio

Primeiro degradou-se o glicogénio isolado e sedimentado em moléculas simples de glicose por meio de hidrólise ácida (dissolvendo o precipitado em 2 mL de HCl 0,7 N; incubação durante 4 horas a 100 °C). O teor de glicose da solução foi determinado por meio de uma reacção enzimática acoplada de um ensaio de amido com um fotómetro (Kontron) a um comprimento de onda de 340 nm, de acordo com as instruções dos fabricantes (Boehringer Manheim). O tampão de reacção contém:

100	mM MOPS, pH 7,5
10	mM $MgCl_2$
2	mM EDTA
0,25	mM NADP
1	mM ATP
1	U/mL Glicose-6-fosfato-Desidrogenase
2	U/mL Hexocinase

A medição foi feita a 25 °C com uma solução de 10 µL de glicose.

(d) Determinação do teor de glicose-6-fosfato

Para determinar o teor de moléculas de glicose fosforiladas na posição C-6, utilizaram-se várias culturas de bactérias. Adicionando os mesmos volumes de KOH 0,7 N aos glicogénios degradados nas suas moléculas de glicose por hidrólise ácida (ver em cima), a solução foi neutralizada.

O tampão da reacção contém:

100	mM MOPS, pH 7,5
10	mM $MgCl_2$
2	mM EDTA
0,25	mM NADP
2	U/ml Glicose-6-fosfato-Desidrogenase

A medição foi feita a 25 °C com uma solução de 100 a 150 µL de glicose.

(e) identificação de uma actividade de enzima fosforilando glicogénio bacteriano

Os resultados de determinação do teor de fosfato de glicogénio das células de E. coli, que tinham sido transformadas com os plasmídeos pACAC + pRL2, exibem um aumento da fosforilação de 290±25% na posição C-6 da glicose, em comparação com a reacção de controlo (células de E.coli transformadas com o plasmídeo pACYC) (ver o quadro seguinte).

Células E. coli	Glicose-6-fosfato:Glicose em Glicogénio
E. coli-K1	1:(4600±1150)
E. coli-K2	1:(1570±390)

Os graus de fosforilação aqui indicados são o valor médio de pelo menos 6 medições partindo de 6 transformações independentes e isolamentos de glicogénio.

Exemplo 10

Integração do plasmídeo p35S-anti-RL em combinação com o plasmídeo p35SH-anti-BE no genoma de plantas de batata

O plasmídeo p35S-anti-RL foi construído como se descreveu no exemplo 6. Construiu-se o plasmídeo p35SH-anti-BE conforme descrito no pedido de patente de invenção WO95/07355, exemplo 3. Ambos os plasmídeos foram transferidos sequencialmente para plantas de batata por meio de uma transformação mediada por Agrobacterium, tal como se descreveu antes. Com esta finalidade, transformou-se primeiro o plasmídeo p35SH-anti-BE para plantas de batata. Regeneraram-se as plantas completas e seleccionaram-se para uma expressão reduzida do gene da enzima ramificada. Em seguida, transformou-se o plasmídeo p35S-anti-RL nas plantas transgénicas que mostraram já uma expressão da enzima de ramificação. A partir das células transformadas, as plantas transgénicas foram novamente regeneradas e as plantas transformadas foram cultivadas em condições de estufa. Analisando o ARN numa análise de mancha do ARN, no que respeita ao desaparecimento dos transcritos complementarmente ao ADNc da enzima ramificada ou o ADNc de RL, avaliou-se o sucesso da modificação genética das plantas no que respeita uma expressão altamente reduzida do gene da

enzima ramificada, assim como no que respeita uma expressão altamente reduzida do gene RL. Para este fim, isolou-se o ARN total das folhas de plantas transformadas de acordo com os processos descritos e subsequentemente separou-se por meio de electroforese em gel, transferiu-se para uma membrana, hibridizou-se com uma sonda marcada radioactivamente mostrando a sequência indicada na Seq. ID nº 1 ou uma parte dela e depois foi hibridizada com uma sonda marcada radioactivamente mostrando a sequência do ADNc da enzima de ramificação (ver patente de invenção WO92/14827, Exemplo 1) ou uma parte dela. Na análise de mancha de ARN, em cerca de 5%-10% das plantas transformadas, a banda indicava o transcrito específico da sequência indicada sob a designação de Seq. ID nº 1, assim como faltava a banda indicando o transcrito específico do ADNc da enzima de ramificação (ver patente de invenção WO92/14827). Estas plantas, que foram designadas por plantas R4 foram utilizadas para a análise da qualidade do amido contido nos tubérculos.

Exemplo 11

Integração do plasmídeo pB33-anti-RL em combinação com o plasmídeo pB33-anti-SALGAI no genoma de plantas de batata

Construiu-se o plasmídeo pB33-anti-RL tal como se descreveu no exemplo 7. Construiu-se o plasmídeo pB33-anti-SALGAI como se segue:

Ligou-se o fragmento *DraI/DraI* da região promotora do gene B33 da Classe I da patatina de *Solanum Tuberosum* compreendendo os nucleótidos -1512 a +14 (Rocha-Sosa *et al.*, EMBO J 8 (1989), 23-29) no sítio de *Sma*I do plasmídeo pUC19.

Do plasmídeo resultante, ligou-se o fragmento promotor numa região de poli-ligante do plasmídeo pBin 19 (Bevan, Nucleic Acids Research 12 (1984), 8711-87211) como um fragmento de *Ecor*I/*Hind*III. Em seguida, o fragmento de *Ecor*I de 3' de 1181 a 2511 do gene SALGAI de *Solanum Tuberosum* (Hergersberg, Dissertação (1988), Universidade de Colónia) foi ligado no sítio de clivagem de *Ecor*I do plasmídeo resultante.

Ambos os plasmídeos foram transferidos sequencialmente para plantas de batata por meio de uma transformação mediada por agrobacterium, tal como descrito no exemplo 10. A partir das células transformadas, regeneraram-se plantas completas e cultivaram-se as plantas transformadas, em condições de estufa. Analisando o ARN completo numa análise de mancha de ARN no que respeita ao desaparecimento dos transcritos complementares aos dois ADNcs avaliou-se o sucesso da modificação genética das plantas. Com este objectivo, isolou-se o ARN total dos tubérculos das plantas transformadas, de acordo com procedimentos padrão e em seguida separou-se em gel de agarose por meio de electroforese em gel, transferindo para a membrana e hibridizando com uma sonda marcada radioactivamente, exibindo a sequência indicada na Seq ID nº 1 ou uma parte dela. Depois, hibridizou-se a mesma membrana com uma sonda marcada radioactivamente comportando a sequência do gene SALGAT ou uma parte desta sequência (Hergersberg, dissertação (19881), Universidade de Colónia). Na análise de mancha ARN, em cerca de 5%-10% das plantas transformadas, a banda indica a hibridização dos transcritos com o ADNc da presente invenção ou o ADNc de SALGAI estavam

faltando. A partir dos tubérculos destas plantas, que se designaram por plantas R3, isolou-se e analisou-se o amido.

Exemplo 12

Análise do amido de plantas R1

Examinaram-se as plantas de batata transformadas de acordo com o exemplo 10, no que respeita às propriedades do amido sintetizado. Realizaram-se as análises com várias linhas das plantas de batata que tinham sido transformadas com os plasmídeos p35S-anti-RL e p35SH-anti-BEs que já não exibiam – ou só exibiam de uma forma muito reduzida – as bandas que indicavam a hibridização dos transcritos com as sequências de ADN da presente invenção ou com a sequência do ADNc de ramificação na análise de mancha de ARN.

a) Determinação de viscosidade de soluções aquosas do amido

Para determinar a viscosidade das soluções aquosas do amido sintetizado nas plantas de batata transformadas, isolou-se o amido dos tubérculos das plantas que tinham sido transformadas com o plasmídeo p35S-anti-RL e o plasmídeo p35SH-anti-BE utilizando processos padrão. Dissolveu-se 2g de cada um dos amidos em 25 mL de H_2O) e utilizou-se para análise com um Analisador rápido de viscosidade (Newport Scientific Pty Ltd, Investment Support Group. Warriewood NSW 2102, Austrália). Utilizou-se o equipamento de acordo com as instruções do fabricante. Para determinar a viscosidade da solução aquosa de amido, aqueceu-se primeiro a suspensão de amido de 50 °C para 95 °C com uma velocidade de 12 °C por minuto. Manteve-se então a temperatura a 95°C durante 2,5

minutos. Depois, arrefeceu-se a solução de 95 °C para 50 °C com uma velocidade de 12 °C por minuto. Durante todo o processo, mediu-se a viscosidade. Os resultados representativos dessas medições são dados sob a forma de gráficos em que se mostra que a viscosidade depende do tempo. A figura 6 mostra um gráfico de ARV típico para amido isolado de plantas de tipo selvagem de batata da variedade Désireé. As linhas 2 e 3 mostram um gráfico de ARV típico para amido isolado de tubérculos de plantas que tinham sido transformadas com o plasmídeo p35S-anti-RL e o plasmídeo p35SH-anti-BE, respectivamente. A linha 4 mostra um gráfico de ARV típico para amido isolado de tubérculos de plantas que tenham sido transformadas com o plasmídeo p35SH-anti-BE em combinação com o plasmídeo p35S-anti-RL. A linha 4 é caracterizada pelo facto de o aumento da viscosidade não ser dependente da temperatura.

b) Determinação da relação amilose/amilopectina

Examinou-se o amido que foi isolado de tubérculos de plantas que tinham sido transformadas, no que respeita à relação amilose para amilopectina. A linha de plantas R4-1 (mostrada na linha 4 da Fig. 6) exibiu um teor de amilose de mais do que 70%. Para a linha de plantas R4-3, mediu-se um valor de amilose de 27%, em que o teor de amilose no amido de tipo selvagem da variedade Désirée varia entre 19 e 22%.

Exemplo 13

Análise do amido das plantas R3

As plantas de batata transformadas de acordo com o exemplo 11 foram examinadas no que respeita às propriedades do amido

sintetizado. As análises foram realizadas com várias linhas de plantas de batata que tinham sido transformadas com os plasmídeos pB33-anti-RL e pB33-anti-SALGAI que já não exibiam – ou só exibiam de uma forma muito reduzida – as bandas que indicavam a hibridização dos transcritos com as sequências de ADN da presente invenção ou com a sequência do ADNc de SALGAI da análise de mancha de ARN.

a) Determinação de viscosidade de soluções aquosas do amido

Para determinar a viscosidade das soluções aquosas do amido sintetizado nas plantas de batata transformadas, isolou-se o amido dos tubérculos das plantas que tinham sido transformadas com o plasmídeo pB33-anti-RL em combinação com o plasmídeo pB33-anti-SALGAI utilizando processos padrão. Determinou-se a viscosidade por meio de um Analisador rápido de viscosidade de acordo com o processo descrito no exemplo 12, parte a. Os resultados estão indicados na figura 7. Na linha 1, figura 7, mostra um gráfico de ARV típico para amido isolado de plantas de tipo selvagem de batata que tinham sido transformadas com o plasmídeo pB33-anti-SALGAI e o plasmídeo p35S-anti-RL, respectivamente. A Linha 4 mostra um gráfico de ARV típico para amido isolado de plantas de batatas que tinham sido transformadas com o plasmídeo pB33-anti-SALGAI em combinação com o plasmídeo pB33S-anti-RL. Este gráfico é caracterizado pelo facto de faltar a viscosidade máxima e o aumento de viscosidade a 50 °C. Além disso, este amido é caracterizado pelo facto de a cola obtida depois dói tratamento da ARV, quase exibir retrogradação depois da incubação à temperatura ambiente durante vários dias.

b) Determinação da relação amilose/amilopectina

Examinou-se o amido que foi isolado de tubérculos de plantas que tinham sido transformadas, no que respeita à relação amilose para amilopectina. A linha de plantas R3-5 (mostrada na linha 4 da Fig. 7) exibiu um teor de amilose de mais inferior a 4%. Para a linha de plantas R3-6, mediu-se um teor de amilose inferior a 3%. O teor de amilose no amido de tipo selvagem da variedade Désirée varia entre 19 e 22%.

c) Determinação de fosfato de amido

Determinou-se o teor de fosfato do amido medindo a quantidade de fosfato ligado à posição C-6 dos resíduos de glicose. Com esta finalidade, primeiro degradou-se o amido por meio de hidrólise ácida e em seguida determinou-se o teor de glicose-6-fosfato, por meio de um ensaio da enzima, tal como se descreve a seguir.

Fez-se a incubação de 100 mg de amido em 500 µL de HCl 0,7 N, durante 4 horas, a 100 °C. Depois da hidrólise ácida, adicionou-se 10 µL da mistura reaccional a 600 µL de tampão de imidazole (100 mM imidazol, $MgCl_2$ 5 mM, pH 6,9, NAD^+ 0,4 mM). A quantidade de glicose-6-fosfato na preparação é determinada pela conversão com a enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase. Para este fim, adicionou-se 1 U de glicose-6-fosfato-desodrogenase (de Leuconostoc mesenteroides (Boehringer Manheim)) à mistura reaccional e determinou-se a quantidade de NADH por meio da absorção a 340 nm.

O teor de glicose-6-fosfato por 1 mg de amido está indicado no quadro que se segue para as plantas de batata não

transformadas da variedade Désirée, assim como para a linha R3-5 e a linha R3-6 das plantas de batatas transgénicas que tinham sido transformadas por pB33-anti-RL em combinação com o plasmídeo pR33-anti-SALGAI. Como comparação, o valor do amido da chamada batata cerosa (US2-10) que tinha sido transformada com o plasmídeo pB33-anti-SALGAI, é também identificado.

Quadro 7

Plantas	nmol Glicose-6-Fosfato/mg de amido	%
Tipo selvagem	9,80±0,68	100
R3-5	1,32±0,10	13
R3-6	1,37±0,15	14
US2-10	10,82±0,42	110

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE:

(A) NOME: Jens Koßmann

(B) RUA: Golmer Fichten 9.

(C) CIDADE: Golm

(E) PAÍS: DE

(F) CÓDIGO POSTAL: 14476

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: plantas que sintetizam um amido modificado, processo para a sua produção e amido modificado

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 4

(iv) VERSÃO LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

(A) SUPORTE DE DADOS: disquete

(B) COMPUTADOR: Compatível com IBM PC

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versão #1.30 (EPA)

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 4856 pares de base

(B) TIPO: Nucleótido

(C) ESTRUTURA HELICOIDAL: helicoidal simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: ADNc a ARNm

(vi) FONTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Solanum tuberosum

(B) ESTIRPE: C.V. Berolina

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) LOCALIZAÇÃO: 105.4497

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: Seq ID N°. 1:

```
CATCTTCATC GAATTTCTCG AAGCTTCTTC GCTAATTTCC TGGTTTCTTC ACTCAAAATC      60

GACGTTTCTA GCTGAACTTG AGTGAATTAA GCCAGTGGGA GGAT ATG AGT AAT TCC      116
                                                 Met Ser Asn Ser
                                                   1

TTA GGG AAT AAC TTG CTG TAC CAG GGA TTC CTA ACC TCA ACA GTG TTG      164
Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr Ser Thr Val Leu
  5                 10                  15                  20

GAA CAT AAA AGT AGA ATC AGT CCT CCT TGT GTT GGA GGC AAT TCT TTG      212
Glu His Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly Gly Asn Ser Leu
                25                  30                  35

TTT CAA CAA CAA GTG ATC TCG AAA TCA CCT TTA TCA ACT GAG TTT CGA      260
```

```
Phe Gln Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser Thr Glu Phe Arg
            40                  45                  50

GGT AAC AGG TTA AAG GTG CAG AAA AAG AAA ATA CCT ATG GAA AAG AAG      308
Gly Asn Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Lys Ile Pro Met Glu Lys Lys
        55                  60                  65

CGT GCT TTT TCT AGT TCT CCT CAT GCT GTA CTT ACC ACT GAT ACC TCT      356
Arg Ala Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr Thr Asp Thr Ser
    70                  75                  80

TCT GAG CTA GCA GAA AAG TTC AGT CTA GGG GGG AAT ATT GAG CTA CAG      404
Ser Glu Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Gly Gly Asn Ile Glu Leu Gln
 85                  90                  95                  100

GTT GAT GTT AGG CCT CCC ACT TCA GGT GAT GTG TCC TTT GTG GAT TTT      452
Val Asp Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asp Val Ser Phe Val Asp Phe
                105                 110                 115

CAA GTA ACA AAT GGT AGT GAT AAA CTG TTT TTG CAC TGG GGG GCA GTA      500
Gln Val Thr Asn Gly Ser Asp Lys Leu Phe Leu His Trp Gly Ala Val
            120                 125                 130

AAA TTC GGG AAA GAA ACA TGG TCT CTT CCG AAT GAT CGT CCA GAT GGG      548
Lys Phe Gly Lys Glu Thr Trp Ser Leu Pro Asn Asp Arg Pro Asp Gly
        135                 140                 145

ACC AAA GTG TAC AAG AAC AAA GCA CTT AGA ACT CCA TTT GTT AAA TCT      596
Thr Lys Val Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Arg Thr Pro Phe Val Lys Ser
    150                 155                 160

GGC TCT AAC TCC ATC CTG AGA CTG GAG ATA CGA GAC ACT GCT ATC GAA      644
Gly Ser Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp Thr Ala Ile Glu
165                 170                 175                 180

GCT ATT GAG TTT CTC ATA TAC GAT GAA GCC CAC GAT AAA TGG ATA AAG      692
Ala Ile Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala His Asp Lys Trp Ile Lys
                185                 190                 195

AAT AAT GGT GGT AAT TTT CGT GTC AAA TTG TCA AGA AAA GAG ATA CGA      740
Asn Asn Gly Gly Asn Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg Lys Glu Ile Arg
            200                 205                 210

GGC CCA GAT GTT TCT GTT CCT GAG GAG CTT GTA CAG ATC CAA TCA TAT      788
Gly Pro Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln Ile Gln Ser Tyr
        215                 220                 225

TTG AGG TGG GAG AGG AAG GGA AAA CAG AAT TAC CCC CCT GAG AAA GAG      836
Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Glu
    230                 235                 240

AAG GAG GAA TAT GAG GCT GCT CGA ACT GTG CTA CAG GAG GAA ATA GCT      884
Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Val Leu Gln Glu Glu Ile Ala
245                 250                 255                 260

CGT GGT GCT TCC ATA CAG GAC ATT CGA GCA AGG CTA ACA AAA ACT AAT      932
Arg Gly Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu Thr Lys Thr Asn
                265                 270                 275
```

```
GAT AAA AGT CAA AGC AAA GAA GAG CCT CTT CAT GTA ACA AAG AGT GAT        980
Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val Thr Lys Ser Asp
            280                 285                 290

ATA CCT GAT GAC CTT GCC CAA GCA CAA GCT TAC ATT AGG TGG GAG AAA       1028
Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile Arg Trp Glu Lys
        295                 300                 305

GCA GGA AAG CCG AAC TAT CCT CCA GAA AAG CAA ATT GAA GAA CTC GAA       1076
Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile Glu Glu Leu Glu
    310                 315                 320

GAA GCA AGA AGA GAA TTG CAA CTT GAG CTT GAG AAA GGC ATT ACC CTT       1124
Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys Gly Ile Thr Leu
325                 330                 335                 340

GAT GAG TTG CGG AAA ACG ATT ACA AAA GGG GAG ATA AAA ACT AAG GTG       1172
Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile Lys Thr Lys Val
                345                 350                 355

GAA AAG CAC CTG AAA AGA AGT TCT TTT GCC GTT GAA AGA ATC CAA AGA       1220
Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu Arg Ile Gln Arg
            360                 365                 370

AAG AAG AGA GAC TTT GGG CAT CTT ATT AAT AAG TAT ACT TCC AGT CCT       1268
Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr Thr Ser Ser Pro
        375                 380                 385

GCA GTA CAA GTA CAA AAG GTC TTG GAA GAA CCA CCA GCC TTA TCT AAA       1316
Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro Ala Leu Ser Lys
    390                 395                 400

ATT AAG CTG TAT GCC AAG GAG AAG GAG GAG CAG ATT GAT GAT CCG ATC       1364
Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile Asp Asp Pro Ile
405                 410                 415                 420

CTA AAT AAA AAG ATC TTT AAG GTC GAT GAT GGG GAG CTA CTG GTA CTG       1412
Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu Leu Leu Val Leu
                425                 430                 435

GTA GCA AAG TCC TCT GGG AAG ACA AAA GTA CAT CTA GCT ACA GAT CTG       1460
Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu Ala Thr Asp Leu
            440                 445                 450

AAT CAG CCA ATT ACT CTT CAC TGG GCA TTA TCC AAA AGT CCT GGA GAG       1508
Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys Ser Pro Gly Glu
        455                 460                 465

TGG ATG GTA CCA CCT TCA AGC ATA TTG CCT CCT GGG TCA ATT ATT TTA       1556
Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly Ser Ile Ile Leu
    470                 475                 480

GAC AAG GCT GCC GAA ACA CCT TTT TCA GCC AGT TCT TCT GAT GGT CTA       1604
Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser Ser Asp Gly Leu
485                 490                 495                 500

ACT TCT AAG GTA CAA TCT TTG GAT ATA GTA ATT GAA GAT GGC AAT TTT       1652
Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu Asp Gly Asn Phe
                505                 510                 515
```

```
GTG GGG ATG CCA TTT GTT CTT TTG TCT GGT GAA AAA TGG ATT AAG AAC      1700
Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys Trp Ile Lys Asn
            520                 525                 530

CAA GGG TCG GAT TTC TAT GTT GGC TTC AGT GCT GCA TCC AAA TTA GCA      1748
Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala Ser Lys Leu Ala
        535                 540                 545

CTC AAG GCT GCT GGG GAT GGC AGT GGA ACT GCA AAG TCT TTA CTG GAT      1796
Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys Ser Leu Leu Asp
    550                 555                 560

AAA ATA GCA GAT ATG GAA AGT GAG GCT CAG AAG TCA TTT ATG CAC CGG      1844
Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser Phe Met His Arg
565                 570                 575                 580

TTT AAT ATT GCA GCT GAC TTG ATA GAA GAT GCC ACT AGT GCT GGT GAA      1892
Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr Ser Ala Gly Glu
                585                 590                 595

CTT GGT TTT GCT GGA ATT CTT GTA TGG ATG AGG TTC ATG GCT ACA AGG      1940
Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe Met Ala Thr Arg
            600                 605                 610

CAA CTG ATA TGG AAC AAA AAC TAT AAC GTA AAA CCA CGT GAA ATA AGC      1988
Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro Arg Glu Ile Ser
        615                 620                 625

AAG GCT CAG GAC AGA CTT ACA GAC TTG TTG CAG AAT GCT TTC ACC AGT      2036
Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn Ala Phe Thr Ser
    630                 635                 640

CAC CCT CAG TAC CGT GAA ATT TTG CGG ATG ATT ATG TCA ACT GTT GGA      2084
His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met Ser Thr Val Gly
645                 650                 655                 660

CGT GGA GGT GAA GGG GAT GTA GGA CAG CGA ATT AGG GAT GAA ATT TTG      2132
Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg Asp Glu Ile Leu
                665                 670                 675

GTC ATC CAG AGG AAC AAT GAC TGC AAG GGT GGT ATG ATG CAA GAA TGG      2180
Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met Met Gln Glu Trp
            680                 685                 690

CAT CAG AAA TTG CAT AAT AAT ACT AGT CCT GAT GAT GTT GTG ATC TGT      2228
His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp Val Val Ile Cys
        695                 700                 705

CAG GCA TTA ATT GAC TAC ATC AAG AGT GAT TTT GAT CTT GGT GTT TAT      2276
Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp Leu Gly Val Tyr
    710                 715                 720

TGG AAA ACC CTG AAT GAG AAC GGA ATA ACA AAA GAG CGT CTT TTG AGT      2324
Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu Arg Leu Leu Ser
725                 730                 735                 740

TAT GAC CGT GCT ATC CAT TCT GAA CCA AAT TTT AGA GGA GAT CAA AAG      2372
Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg Gly Asp Gln Lys
                745                 750                 755
```

```
GGT GGT CTT TTG CGT GAT TTA GGT CAC TAT ATG AGA ACA TTG AAG GCA      2420
Gly Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg Thr Leu Lys Ala
          760                 765                 770

GTT CAT TCA GGT GCA GAT CTT GAG TCT GCT ATT GCA AAC TGC ATG GGC      2468
Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala Asn Cys Met Gly
        775                 780                 785

TAC AAA ACT GAG GGA GAA GGC TTT ATG GTT GGA GTC CAG ATA AAT CCT      2516
Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val Gln Ile Asn Pro
    790                 795                 800

GTA TCA GGC TTG CCA TCT GGC TTT CAG GAC CTC CTC CAT TTT GTC TTA      2564
Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Asp Leu Leu His Phe Val Leu
805                 810                 815                 820

GAC CAT GTG GAA GAT AAA AAT GTG GAA ACT CTT CTT GAG AGA TTG CTA      2612
Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu Glu Arg Leu Leu
                825                 830                 835

GAG GCT CGT GAG GAG CTT AGG CCC TTG CTT CTC AAA CCA AAC AAC CGT      2660
Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys Pro Asn Asn Arg
          840                 845                 850

CTA AAG GAT CTG CTG TTT TTG GAC ATA GCA CTT GAT TCT ACA GTT AGA      2708
Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp Ser Thr Val Arg
        855                 860                 865

ACA GCA GTA GAA AGG GGA TAT GAA GAA TTG AAC AAC GCT AAT CCT GAG      2756
Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn Ala Asn Pro Glu
    870                 875                 880

AAA ATC ATG TAC TTC ATC TCC CTC GTT CTT GAA AAT CTC GCA CTC TCT      2804
Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn Leu Ala Leu Ser
885                 890                 895                 900

GTG GAC GAT AAT GAA GAT CTT GTT TAT TGC TTG AAG GGA TGG AAT CAA      2852
Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys Gly Trp Asn Gln
                905                 910                 915

GCT CTT TCA ATG TCC AAT GGT GGG GAC AAC CAT TGG GCT TTA TTT GCA      2900
Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp Ala Leu Phe Ala
          920                 925                 930

AAA GCT GTG CTT GAC AGA ACC CGT CTT GCA CTT GCA AGC AAG GCA GAG      2948
Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala Ser Lys Ala Glu
        935                 940                 945

TGG TAC CAT CAC TTA TTG CAG CCA TCT GCC GAA TAT CTA GGA TCA ATA      2996
Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly Ser Ile
    950                 955                 960

CTT GGG GTG GAC CAA TGG GCT TTG AAC ATA TTT ACT GAA GAA ATT ATA      3044
Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu Ile Ile
965                 970                 975                 980

CGT GCT GGA TCA GCA GCT TCA TTA TCC TCT CTT CTT AAT AGA CTC GAT      3092
Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asn Arg Leu Asp
                985                 990                 995
```

```
CCC GTG CTT CGG AAA ACT GCA AAT CTA GGA AGT TGG CAG ATT ATC AGT      3140
Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln Ile Ile Ser
            1000                1005                1010

CCA GTT GAA GCC GTT GGA TAT GTT GTC GTT GTG GAT GAG TTG CTT TCA      3188
Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu Leu Ser
        1015                1020                1025

GTT CAG AAT GAA ATC TAC GAG AAG CCC ACG ATC TTA GTA GCA AAA TCT      3236
Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala Lys Ser
    1030                1035                1040

GTT AAA GGA GAG GAG GAA ATT CCT GAT GGT GCT GTT GCC CTG ATA ACA      3284
Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala Leu Ile Thr
1045                1050                1055                1060

CCA GAC ATG CCA GAT GTT CTT TCA CAT GTT TCT GTT CGA GCT AGA AAT      3332
Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala Arg Asn
                1065                1070                1075

GGG AAG GTT TGC TTT GCT ACA TGC TTT GAT CCC AAT ATA TTG GCT GAC      3380
Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu Ala Asp
            1080                1085                1090

CTC CAA GCA AAG GAA GGA AGG ATT TTG CTC TTA AAG CCT ACA CCT TCA      3428
Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr Pro Ser
        1095                1100                1105

GAC ATA ATC TAT AGT GAG GTG AAT GAG ATT GAG CTC CAA AGT TCA AGT      3476
Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu Gln Ser Ser Ser
    1110                1115                1120

AAC TTG GTA GAA GCT GAA ACT TCA GCA ACA CTT AGA TTG GTG AAA AAG      3524
Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val Lys Lys
1125                1130                1135                1140

CAA TTT GGT GGT TGT TAC GCA ATA TCA GCA GAT GAA TTC ACA AGT GAA      3572
Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr Ser Glu
                1145                1150                1155

ATG GTT GGA GCT AAA TCA CGT AAT ATT GCA TAT CTG AAA GGA AAA GTG      3620
Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly Lys Val
            1160                1165                1170

CCT TCC TCG GTG GGA ATT CCT ACG TCA GTA GCT CTT CCA TTT GGA GTC      3668
Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe Gly Val
        1175                1180                1185

TTT GAG AAA GTA CTT TCA GAC GAC ATA AAT CAG GGA GTG GCA AAA GAG      3716
Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala Lys Glu
    1190                1195                1200

TTG CAA ATT CTG ATG AAA AAA CTA TCT GAA GGA GAC TTC AGC GCT CTT      3764
Leu Gln Ile Leu Met Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser Ala Leu
1205                1210                1215                1220

GGT GAA ATT CGC ACA ACG GTT TTA GAT CTT TCA GCA CCA GCT CAA TTG      3812
Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Ala Pro Ala Gln Leu
                1225                1230                1235
```

```
GTC AAA GAG CTG AAG GAG AAG ATG CAG GGT TCT GGC ATG CCT TGG CCT      3860
Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro Trp Pro
            1240                1245                1250

GGT GAT GAA GGT CCA AAG CGG TGG GAA CAA GCA TGG ATG GCC ATA AAA      3908
Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala Ile Lys
        1255                1260                1265

AAG GTG TGG GCT TCA AAA TGG AAT GAG AGA GCA TAC TTC AGC ACA AGG      3956
Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser Thr Arg
    1270                1275                1280

AAG GTG AAA CTG GAT CAT GAC TAT CTG TGC ATG GCT GTC CTT GTT CAA      4004
Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu Val Gln
1285                1290                1295                1300

GAA ATA ATA AAT GCT GAT TAT GCA TTT GTC ATT CAC ACA ACC AAC CCA      4052
Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr Asn Pro
                1305                1310                1315

TCT TCC GGA GAC GAC TCA GAA ATA TAT GCC GAG GTG GTC AGG GGC CTT      4100
Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg Gly Leu
            1320                1325                1330

GGG GAA ACA CTT GTT GGA GCT TAT CCA GGA CGT GCT TTG AGT TTT ATC      4148
Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser Phe Ile
        1335                1340                1345

TGC AAG AAA AAG GAT CTC AAC TCT CCT CAA GTG TTA GGT TAC CCA AGC      4196
Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr Pro Ser
    1350                1355                1360

AAA CCG ATC GGC CTT TTC ATA AAA AGA TCT ATC ATC TTC CGA TCT GAT      4244
Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg Ser Asp
1365                1370                1375                1380

TCC AAT GGG GAA GAT TTG GAA GGT TAT GCC GGT GCT GGC CTC TAC GAC      4292
Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu Tyr Asp
                1385                1390                1395

AGT GTA CCA ATG GAT GAG GAG GAA AAA GTT GTA ATT GAT TAC TCT TCC      4340
Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr Ser Ser
            1400                1405                1410

GAC CCA TTG ATA ACT GAT GGT AAC TTC CGC CAG ACA ATC CTG TCC AAC      4388
Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu Ser Asn
        1415                1420                1425

ATT GCT CGT GCT GGA CAT GCT ATC GAG GAG CTA TAT GGC TCT CCT CAA      4436
Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser Pro Gln
    1430                1435                1440

GAC ATT GAG GGT GTA GTG AGG GAT GGA AAG ATT TAT GTC GTT CAG ACA      4484
Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val Gln Thr
1445                1450                1455                1460

AGA CCA CAG ATG T GATTATATTC TCGTTGTATG TTGTTCAGAG AAGACCACAG        4537
Arg Pro Gln Met

ATGTGATCAT ATTCTCATTG TATCAGATCT GTGACCACTT ACCTGATACC TCCCATGAAG    4597
```

TTACCTGTAT GATTATACGT GATCCAAAGC CATCACATCA TGTTCACCTT CAGCTATTGG 4657

AGGAGAAGTG AGAAGTAGGA ATTGCAATAT GAGGAATAAT AAGAAAAACT TTGTAAAAGC 4717

TAAATTAGCT GGGTATGATA TAGGGAGAAA TGTGTAAACA TTGTACTATA TATAGTATAT 4777

ACACACGCAT TATGTATTGC ATTATGCACT GAATAATATC GCAGCATCAA AGAAGAAATC 4837

CTTTGGGTGG TTTCAAAAA 4856

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA SEQ ID N° 2:

(i) CARACTERÍSTICA DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 1464 aminoácidos

(B) TIPO: Aminoácido

(C) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N° 2:

```
Met Ser Asn Ser Leu Gly Asn Asn Leu Leu Tyr Gln Gly Phe Leu Thr
  1               5                  10                  15

Ser Thr Val Leu Glu His Lys Ser Arg Ile Ser Pro Pro Cys Val Gly
            20                  25                  30

Gly Asn Ser Leu Phe Gln Gln Gln Val Ile Ser Lys Ser Pro Leu Ser
        35                  40                  45

Thr Glu Phe Arg Gly Asn Arg Leu Lys Val Gln Lys Lys Lys Ile Pro
    50                  55                  60

Met Glu Lys Lys Arg Ala Phe Ser Ser Ser Pro His Ala Val Leu Thr
65                  70                  75                  80

Thr Asp Thr Ser Ser Glu Leu Ala Glu Lys Phe Ser Leu Gly Gly Asn
                85                  90                  95

Ile Glu Leu Gln Val Asp Val Arg Pro Pro Thr Ser Gly Asp Val Ser
            100                 105                 110

Phe Val Asp Phe Gln Val Thr Asn Gly Ser Asp Lys Leu Phe Leu His
        115                 120                 125

Trp Gly Ala Val Lys Phe Gly Lys Glu Thr Trp Ser Leu Pro Asn Asp
    130                 135                 140

Arg Pro Asp Gly Thr Lys Val Tyr Lys Asn Lys Ala Leu Arg Thr Pro
145                 150                 155                 160

Phe Val Lys Ser Gly Ser Asn Ser Ile Leu Arg Leu Glu Ile Arg Asp
                165                 170                 175

Thr Ala Ile Glu Ala Ile Glu Phe Leu Ile Tyr Asp Glu Ala His Asp
            180                 185                 190

Lys Trp Ile Lys Asn Asn Gly Gly Asn Phe Arg Val Lys Leu Ser Arg
        195                 200                 205
```

```
Lys Glu Ile Arg Gly Pro Asp Val Ser Val Pro Glu Glu Leu Val Gln
    210                 215                 220

Ile Gln Ser Tyr Leu Arg Trp Glu Arg Lys Gly Lys Gln Asn Tyr Pro
225                 230                 235                 240

Pro Glu Lys Glu Lys Glu Glu Tyr Glu Ala Ala Arg Thr Val Leu Gln
                245                 250                 255

Glu Glu Ile Ala Arg Gly Ala Ser Ile Gln Asp Ile Arg Ala Arg Leu
            260                 265                 270

Thr Lys Thr Asn Asp Lys Ser Gln Ser Lys Glu Glu Pro Leu His Val
        275                 280                 285

Thr Lys Ser Asp Ile Pro Asp Asp Leu Ala Gln Ala Gln Ala Tyr Ile
    290                 295                 300

Arg Trp Glu Lys Ala Gly Lys Pro Asn Tyr Pro Pro Glu Lys Gln Ile
305                 310                 315                 320

Glu Glu Leu Glu Glu Ala Arg Arg Glu Leu Gln Leu Glu Leu Glu Lys
                325                 330                 335

Gly Ile Thr Leu Asp Glu Leu Arg Lys Thr Ile Thr Lys Gly Glu Ile
            340                 345                 350

Lys Thr Lys Val Glu Lys His Leu Lys Arg Ser Ser Phe Ala Val Glu
        355                 360                 365

Arg Ile Gln Arg Lys Lys Arg Asp Phe Gly His Leu Ile Asn Lys Tyr
    370                 375                 380

Thr Ser Ser Pro Ala Val Gln Val Gln Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro
385                 390                 395                 400

Ala Leu Ser Lys Ile Lys Leu Tyr Ala Lys Glu Lys Glu Glu Gln Ile
                405                 410                 415

Asp Asp Pro Ile Leu Asn Lys Lys Ile Phe Lys Val Asp Asp Gly Glu
            420                 425                 430

Leu Leu Val Leu Val Ala Lys Ser Ser Gly Lys Thr Lys Val His Leu
        435                 440                 445

Ala Thr Asp Leu Asn Gln Pro Ile Thr Leu His Trp Ala Leu Ser Lys
    450                 455                 460

Ser Pro Gly Glu Trp Met Val Pro Pro Ser Ser Ile Leu Pro Pro Gly
465                 470                 475                 480

Ser Ile Ile Leu Asp Lys Ala Ala Glu Thr Pro Phe Ser Ala Ser Ser
                485                 490                 495

Ser Asp Gly Leu Thr Ser Lys Val Gln Ser Leu Asp Ile Val Ile Glu
            500                 505                 510

Asp Gly Asn Phe Val Gly Met Pro Phe Val Leu Leu Ser Gly Glu Lys
        515                 520                 525
```

```
Trp Ile Lys Asn Gln Gly Ser Asp Phe Tyr Val Gly Phe Ser Ala Ala
    530                 535                 540

Ser Lys Leu Ala Leu Lys Ala Ala Gly Asp Gly Ser Gly Thr Ala Lys
545                 550                 555                 560

Ser Leu Leu Asp Lys Ile Ala Asp Met Glu Ser Glu Ala Gln Lys Ser
                565                 570                 575

Phe Met His Arg Phe Asn Ile Ala Ala Asp Leu Ile Glu Asp Ala Thr
            580                 585                 590

Ser Ala Gly Glu Leu Gly Phe Ala Gly Ile Leu Val Trp Met Arg Phe
        595                 600                 605

Met Ala Thr Arg Gln Leu Ile Trp Asn Lys Asn Tyr Asn Val Lys Pro
    610                 615                 620

Arg Glu Ile Ser Lys Ala Gln Asp Arg Leu Thr Asp Leu Leu Gln Asn
625                 630                 635                 640

Ala Phe Thr Ser His Pro Gln Tyr Arg Glu Ile Leu Arg Met Ile Met
                645                 650                 655

Ser Thr Val Gly Arg Gly Gly Glu Gly Asp Val Gly Gln Arg Ile Arg
            660                 665                 670

Asp Glu Ile Leu Val Ile Gln Arg Asn Asn Asp Cys Lys Gly Gly Met
        675                 680                 685

Met Gln Glu Trp His Gln Lys Leu His Asn Asn Thr Ser Pro Asp Asp
    690                 695                 700

Val Val Ile Cys Gln Ala Leu Ile Asp Tyr Ile Lys Ser Asp Phe Asp
705                 710                 715                 720

Leu Gly Val Tyr Trp Lys Thr Leu Asn Glu Asn Gly Ile Thr Lys Glu
                725                 730                 735

Arg Leu Leu Ser Tyr Asp Arg Ala Ile His Ser Glu Pro Asn Phe Arg
            740                 745                 750

Gly Asp Gln Lys Gly Gly Leu Leu Arg Asp Leu Gly His Tyr Met Arg
        755                 760                 765

Thr Leu Lys Ala Val His Ser Gly Ala Asp Leu Glu Ser Ala Ile Ala
    770                 775                 780

Asn Cys Met Gly Tyr Lys Thr Glu Gly Glu Gly Phe Met Val Gly Val
785                 790                 795                 800

Gln Ile Asn Pro Val Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Gln Asp Leu Leu
                805                 810                 815

His Phe Val Leu Asp His Val Glu Asp Lys Asn Val Glu Thr Leu Leu
            820                 825                 830

Glu Arg Leu Leu Glu Ala Arg Glu Glu Leu Arg Pro Leu Leu Leu Lys
        835                 840                 845
```

```
Pro Asn Asn Arg Leu Lys Asp Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ala Leu Asp
    850                 855                 860

Ser Thr Val Arg Thr Ala Val Glu Arg Gly Tyr Glu Glu Leu Asn Asn
865                 870                 875                 880

Ala Asn Pro Glu Lys Ile Met Tyr Phe Ile Ser Leu Val Leu Glu Asn
                885                 890                 895

Leu Ala Leu Ser Val Asp Asp Asn Glu Asp Leu Val Tyr Cys Leu Lys
            900                 905                 910

Gly Trp Asn Gln Ala Leu Ser Met Ser Asn Gly Gly Asp Asn His Trp
        915                 920                 925

Ala Leu Phe Ala Lys Ala Val Leu Asp Arg Thr Arg Leu Ala Leu Ala
    930                 935                 940

Ser Lys Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr
945                 950                 955                 960

Leu Gly Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr
                965                 970                 975

Glu Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu
            980                 985                 990

Asn Arg Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp
        995                 1000                1005

Gln Ile Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp
    1010                1015                1020

Glu Leu Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu
1025                1030                1035                1040

Val Ala Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val
                1045                1050                1055

Ala Leu Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val
            1060                1065                1070

Arg Ala Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn
        1075                1080                1085

Ile Leu Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys
    1090                1095                1100

Pro Thr Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu
1105                1110                1115                1120

Gln Ser Ser Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg
                1125                1130                1135

Leu Val Lys Lys Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu
            1140                1145                1150

Phe Thr Ser Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu
        1155                1160                1165
```

```
Lys Gly Lys Val Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu
    1170                1175                1180

Pro Phe Gly Val Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly
1185                1190                1195                1200

Val Ala Lys Glu Leu Gln Ile Leu Met Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp
                1205                1210                1215

Phe Ser Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Ala
            1220                1225                1230

Pro Ala Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly
        1235                1240                1245

Met Pro Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp
    1250                1255                1260

Met Ala Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr
1265                1270                1275                1280

Phe Ser Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala
                1285                1290                1295

Val Leu Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His
            1300                1305                1310

Thr Thr Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val
        1315                1320                1325

Val Arg Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala
    1330                1335                1340

Leu Ser Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu
1345                1350                1355                1360

Gly Tyr Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile
                1365                1370                1375

Phe Arg Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala
            1380                1385                1390

Gly Leu Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile
        1395                1400                1405

Asp Tyr Ser Ser Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr
    1410                1415                1420

Ile Leu Ser Asn Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr
1425                1430                1435                1440

Gly Ser Pro Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr
                1445                1450                1455

Val Val Gln Thr Arg Pro Gln Met
            1460
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA SEQ ID N° 3:

(i) CARACTERÍSTICA DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 1918 aminoácidos

(B) TIPO: Nucleótido

(C) ESTRUTURA HELICOIDAL: estrutura helicoidal simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc a ARNm

(vi) FONTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: solanum tuberosum

(B) ESTIRPE: C.V. Desiree

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: cds

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..1555

DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N° 3:

```
GCA GAG TGG TAC CAT CAC TTA TTG CAG CCA TCT GCC GAA TAT CTA GGA        48
Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly
  1               5                  10                  15

TCA ATA CTT GGG GTG GAC CAA TGG GCT TTG AAC ATA TTT ACT GAA GAA        96
Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu
            20                  25                  30

ATT ATA CGT GCT GGA TCA GCA GCT TCA TTA TCC TCT CTT CTT AAT AGA       144
Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asn Arg
        35                  40                  45

CTC GAT CCC GTG CTT CGG AAA ACT GCA AAT CTA GGA AGT TGG CAG ATT       192
Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln Ile
    50                  55                  60

ATC AGT CCA GTT GAA GCC GTT GGA TAT GTT GTC GTT GTG GAT GAG TTG       240
Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu
65                  70                  75                  80

CTT TCA GTT CAG AAT GAA ATC TAC GAG AAG CCC ACG ATC TTA GTA GCA       288
Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala
                85                  90                  95

AAA TCT GTT AAA GGA GAG GAG GAA ATT CCT GAT GGT GCT GTT GCC CTG       336
Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala Leu
            100                 105                 110

ATA ACA CCA GAC ATG CCA GAT GTT CTT TCA CAT GTT TCT GTT CGA GCT       384
Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala
        115                 120                 125

AGA AAT GGG AAG GTT TGC TTT GCT ACA TGC TTT GAT CCC AAT ATA TTG       432
Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu
    130                 135                 140

GCT GAC CTC CAA GCA AAG GAA GGA AGG ATT TTG CTC TTA AAG CCT ACA       480
Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr
145                 150                 155                 160
```

```
CCT TCA GAC ATA ATC TAT AGT GAG GTG AAT GAG ATT GAG CTC CAA AGT       528
Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu Gln Ser
                165                 170                 175

TCA AGT AAC TTG GTA GAA GCT GAA ACT TCA GCA ACA CTT AGA TTG GTG       576
Ser Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val
            180                 185                 190

AAA AAG CAA TTT GGT GGT TGT TAC GCA ATA TCA GCA GAT GAA TTC ACA       624
Lys Lys Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr
        195                 200                 205

AGT GAA ATG GTT GGA GCT AAA TCA CGT AAT ATT GCA TAT CTG AAA GGA       672
Ser Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly
    210                 215                 220

AAA GTG CCT TCC TCG GTG GGA ATT CCT ACG TCA GTA GCT CTT CCA TTT       720
Lys Val Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe
225                 230                 235                 240

GGA GTC TTT GAG AAA GTA CTT TCA GAC GAC ATA AAT CAG GGA GTG GCA       768
Gly Val Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala
                245                 250                 255

AAA GAG TTG CAA ATT CTG ACA AAA AAA CTA TCT GAA GGA GAC TTT AGC       816
Lys Glu Leu Gln Ile Leu Thr Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser
            260                 265                 270

GCT CTT GGT GAA ATT CGC ACA ACG GTT TTA GAT CTT TCG ACA CCA GCT       864
Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Thr Pro Ala
        275                 280                 285

CAA TTG GTC AAA GAG CTG AAG GAG AAG ATG CAG GGT TCT GGC ATG CCT       912
Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro
    290                 295                 300

TGG CCT GGT GAT GAA GGT CCA AAG CGG TGG GAA CAA GCA TGG ATG GCC       960
Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala
305                 310                 315                 320

ATA AAA AAG GTG TGG GCT TCA AAA TGG AAT GAG AGA GCA TAC TTC AGC      1008
Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser
                325                 330                 335

ACA AGG AAG GTG AAA CTG GAT CAT GAC TAT CTG TGC ATG GCT GTC CTT      1056
Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu
            340                 345                 350

GTT CAA GAA ATA ATA AAT GCT GAT TAT GCA TTT GTC ATT CAC ACA ACC      1104
Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr
        355                 360                 365

AAC CCA TCT TCC GGA GAC GAC TCA GAA ATA TAT GCC GAG GTG GTC AGG      1152
Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg
    370                 375                 380

GGC CTT GGG GAA ACA CTT GTT GGA GCT TAT CCA GGA CGT GCT TTG AGT      1200
Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser
385                 390                 395                 400
```

```
TTT ATC TGC AAG AAA AAG GAT CTC AAC TCT CCT CAA GTG TTA GGT TAC      1248
Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr
                405                 410                 415

CCA AGC AAA CCG ATC GGC CTT TTC ATA AAA AGA TCT ATC ATC TTC CGA      1296
Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg
            420                 425                 430

TCT GAT TCC AAT GGG GAA GAT TTG GAA GGT TAT GCC GGT GCT GGC CTC      1344
Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu
        435                 440                 445

TAC GAC AGT GTA CCA ATG GAT GAG GAG GAA AAA GTT GTA ATT GAT TAC      1392
Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr
    450                 455                 460

TCT TCC GAC CCA TTG ATA ACT GAT GGT AAC TTC CGC CAG ACA ATC CTG      1440
Ser Ser Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu
465                 470                 475                 480

TCC AAC ATT GCT CGT GCT GGA CAT GCT ATC GAG GAG CTA TAT GGC TCT      1488
Ser Asn Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser
                485                 490                 495

CCT CAA GAC ATT GAG GGT GTA GTG AGG GAT GGA AAG ATT TAT GTC GTT      1536
Pro Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val
            500                 505                 510

CAG ACA AGA CCA CAG ATG T GATTATATTC TCGTTGTATG TTGTTCAGAG           1585
Gln Thr Arg Pro Gln Met
        515

AAGACCACAG ATGTGATCAT ATTCTCATTG TATCAGATCT GTGACCACTT ACCTGATACC    1645

TCCCATGAAG TTACCTGTAT GATTATACGT GATCCAAAGC CATCACATCA TGTTCACCTT    1705

CAGCTATTGG AGGAGAAGTG AGAAGTAGGA ATTGCAATAT GAGGAATAAT AAGAAAAACT    1765

TTGTAAAAGC TAAATTAGCT GGGTATGATA TAGGGAGAAA TGTGTAAACA TTGTACTATA    1825

TATAGTATAT ACACACGCAT TATGTATTGC ATTATGCACT GAATAATATC GCAGCATCAA    1885

AGAAGAAATC CTTTGGGTGG TTTCAAAAAA AAA                                 1918
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQUÊNCIA SEQ ID N° 4:

(i) CARACTERÍSTICA DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 518 aminoácidos

(B) TIPO: Aminoácidos

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína

DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N° 4:

```
Ala Glu Trp Tyr His His Leu Leu Gln Pro Ser Ala Glu Tyr Leu Gly
 1               5                  10                  15

Ser Ile Leu Gly Val Asp Gln Trp Ala Leu Asn Ile Phe Thr Glu Glu
            20                  25                  30

Ile Ile Arg Ala Gly Ser Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asn Arg
        35                  40                  45

Leu Asp Pro Val Leu Arg Lys Thr Ala Asn Leu Gly Ser Trp Gln Ile
    50                  55                  60

Ile Ser Pro Val Glu Ala Val Gly Tyr Val Val Val Val Asp Glu Leu
65                  70                  75                  80

Leu Ser Val Gln Asn Glu Ile Tyr Glu Lys Pro Thr Ile Leu Val Ala
                85                  90                  95

Lys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Ile Pro Asp Gly Ala Val Ala Leu
            100                 105                 110

Ile Thr Pro Asp Met Pro Asp Val Leu Ser His Val Ser Val Arg Ala
        115                 120                 125

Arg Asn Gly Lys Val Cys Phe Ala Thr Cys Phe Asp Pro Asn Ile Leu
    130                 135                 140

Ala Asp Leu Gln Ala Lys Glu Gly Arg Ile Leu Leu Leu Lys Pro Thr
145                 150                 155                 160

Pro Ser Asp Ile Ile Tyr Ser Glu Val Asn Glu Ile Glu Leu Gln Ser
                165                 170                 175

Ser Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Thr Ser Ala Thr Leu Arg Leu Val
            180                 185                 190

Lys Lys Gln Phe Gly Gly Cys Tyr Ala Ile Ser Ala Asp Glu Phe Thr
        195                 200                 205

Ser Glu Met Val Gly Ala Lys Ser Arg Asn Ile Ala Tyr Leu Lys Gly
    210                 215                 220

Lys Val Pro Ser Ser Val Gly Ile Pro Thr Ser Val Ala Leu Pro Phe
225                 230                 235                 240

Gly Val Phe Glu Lys Val Leu Ser Asp Asp Ile Asn Gln Gly Val Ala
                245                 250                 255

Lys Glu Leu Gln Ile Leu Thr Lys Lys Leu Ser Glu Gly Asp Phe Ser
            260                 265                 270

Ala Leu Gly Glu Ile Arg Thr Thr Val Leu Asp Leu Ser Thr Pro Ala
        275                 280                 285

Gln Leu Val Lys Glu Leu Lys Glu Lys Met Gln Gly Ser Gly Met Pro
    290                 295                 300

Trp Pro Gly Asp Glu Gly Pro Lys Arg Trp Glu Gln Ala Trp Met Ala
305                 310                 315                 320

Ile Lys Lys Val Trp Ala Ser Lys Trp Asn Glu Arg Ala Tyr Phe Ser
                325                 330                 335

Thr Arg Lys Val Lys Leu Asp His Asp Tyr Leu Cys Met Ala Val Leu
            340                 345                 350
```

```
Val Gln Glu Ile Ile Asn Ala Asp Tyr Ala Phe Val Ile His Thr Thr
        355                 360                 365

Asn Pro Ser Ser Gly Asp Asp Ser Glu Ile Tyr Ala Glu Val Val Arg
    370                 375                 380

Gly Leu Gly Glu Thr Leu Val Gly Ala Tyr Pro Gly Arg Ala Leu Ser
385                 390                 395                 400

Phe Ile Cys Lys Lys Lys Asp Leu Asn Ser Pro Gln Val Leu Gly Tyr
                405                 410                 415

Pro Ser Lys Pro Ile Gly Leu Phe Ile Lys Arg Ser Ile Ile Phe Arg
            420                 425                 430

Ser Asp Ser Asn Gly Glu Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Leu
        435                 440                 445

Tyr Asp Ser Val Pro Met Asp Glu Glu Glu Lys Val Val Ile Asp Tyr
    450                 455                 460

Ser Ser Asp Pro Leu Ile Thr Asp Gly Asn Phe Arg Gln Thr Ile Leu
465                 470                 475                 480

Ser Asn Ile Ala Arg Ala Gly His Ala Ile Glu Glu Leu Tyr Gly Ser
                485                 490                 495

Pro Gln Asp Ile Glu Gly Val Val Arg Asp Gly Lys Ile Tyr Val Val
            500                 505                 510

Gln Thr Arg Pro Gln Met
        515
```

Lisboa, 28 de Janeiro de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de um amido, caracterizado por o amido ser isolado de células de plantas transgénicas ou de plantas transgénicas contando tais células de plantas transgénicas, em que as células de plantas transgénicas são caracterizadas por serem transformadas com uma molécula de ácido nucleico, o qual codifica uma proteína, a qual se encontra nas células de plantas, tanto em ligação a um grão de amido, como na forma solúvel, e cuja redução nas células de plantas conduz à síntese de um amido com reduzido teor de fosfato ou a qual conduz a uma fosforilação do glicogénio sintetisado nas células, aquando da expressão de E. coli, em que a molécula de ácido nucleico é seleccionada do grupo composto por:

(a) moléculas de ácidos nucleicos que codificam uma proteína com a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID N°2;
(b) moléculas de ácidos nucleicos que compreendem a região de codificação da sequência de nucleótidos indicada na SEQ ID N° 1;
(c) moléculas de ácidos nucleicos, as quais se hibridizam com as moléculas de ácidos nucleicos mencionadas em (a) ou (b) e as quais codificam uma proteína, a qual se encontra em células de plantas tanto ligadas a grãos de amido, como também na forma solúvel, e cuja redução nas células de plantas conduz à síntese de um amido com baixo teor de fosfato, ou a qual conduz a uma fosforilação do glicogénio sintetizado na célula aquando em expressão de E. coli.

(d) moléculas de ácidos nucleicos de (c), em que a hibridização tem lugar em condições severas;

(e) moléculas de ácidos nucleicos cuja sequência é pelo menos 60% idêntica à da região de codificação da sequência de nucleótidos indicada na SEQ ID N° 1; e as quais codificam uma proteína a qual em células de plantas se encontra não só ligada ao grão de amido, mas também na forma solúvel, e cuja redução nas células de plantas conduz à síntese de um amido com reduzido teor de fosfato ou a qual conduz a uma fosforilação do glicogénio sintetisado nas células, aquando da expressão de E. coli, e

(f) Fragmentos das moléculas de ácido nucleico mencionadas em (a) a (e), em que os fragmentos possuem comprimento suficiente para codificar uma proteína, a qual se encontra em células de plantas tanto em ligação aos grãos de amido, como também na forma solúvel e cuja redução nas células de plantas conduz à síntese de um amido com reduzido teor de fosfato ou a qual conduz a uma fosforilação do glicogénio sintetizado nas células, aquando da expressão de E. coli;

em que esta molécula de ácido nucleico é associada a elementos de ADN reguladores, os quais garantem a transcrição e tradução em células de plantas.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as células de plantas transgénicas são caracterizadas por serem células de plantas como milho, arroz ou cevada.

3. Método para a produção de um amido, caracterizado por o amido ser isolado de células de plantas transgénicas ou de plantas transgénicas contendo tais células de plantas transgénicas, em que as células de plantas transgénicas são caracterizadas por

(A) ser inibida nas mesmas a expressão de uma proteína, a qual se encontra em células de plantas tanto em ligação aos grãos de amido, como também na forma solúvel e cuja redução nas células de plantas conduz à síntese de um amido com reduzido teor de fosfato ou a qual conduz a uma fosforilação do glicogénio sintetizado nas células, aquando da expressão de E. coli e a qual é codificada por uma molécula de ácido nucleico, seleccionada do grupo composto por:

(a) moléculas de ácidos nucleicos que codificam uma proteína com a sequência de aminoácidos indicada na SEQ ID N°2;
(b) moléculas de ácidos nucleicos que compreendem a região de codificação da sequência de nucleótidos indicada na SEQ ID N° 1;
(c) moléculas de ácidos nucleicos, as quais se hibridizam com as moléculas de ácidos nucleicos mencionadas em (a) ou (b) e as quais codificam uma proteína, a qual se encontra em células de plantas tanto ligadas a grãos de amido, como também na forma solúvel, e cuja redução nas células de plantas conduz à síntese de um amido com baixo teor de fosfato, ou a qual conduz a uma fosforilação do glicogénio sintetizado na célula aquando em expressão de E. coli.

(d) moléculas de ácidos nucleicos de (c), em que a hibridização tem lugar em condições severas;

(e) moléculas de ácidos nucleicos cuja sequência é pelo menos 60% idêntica à da região de codificação da sequência de nucleótidos indicada na SEQ ID N° 1; e as quais codificam uma proteína a qual em células de plantas se encontra não só ligada ao grão de amido, mas também na forma solúvel, e cuja redução nas células de plantas conduz à síntese de um amido com reduzido teor de fosfato ou a qual conduz a uma fosforilação do glicogénio sintetizado nas células, aquando da expressão de E. coli, e

e em que as células de plantas transgénicas são caracterizadas por

(B)

(i) conterem uma molécula de ADN, a qual é expressa e codifica um ARN de sentido inverso, o qual inibe a expressão de uma molécula de ácido nucleico de acordo com (a) a € na célula; ou

(ii) conterem uma molécula de ADN, a qual é expressa e codifica uma ribozima que cliva transcritos específicos de uma molécula de ácido nucleico de acordo com (a) e (b); ou

(iii) conterem uma molécula de ADN, a qual, aquando de expressão numa célula de planta devido a um efeito de co-supressão é expressa e codifica um ARN, o qual conduz à redução da expressão de uma molécula de ácido nucleico de acordo com (a) a (e), e que apresenta uma elevado grau de homologia de transcrição da referida molécula de ácido nucleico.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que as células de plantas transgénicas são ainda caracterizadas por serem células de plantas de batata.

Lisboa, 28 de Janeiro de 2010

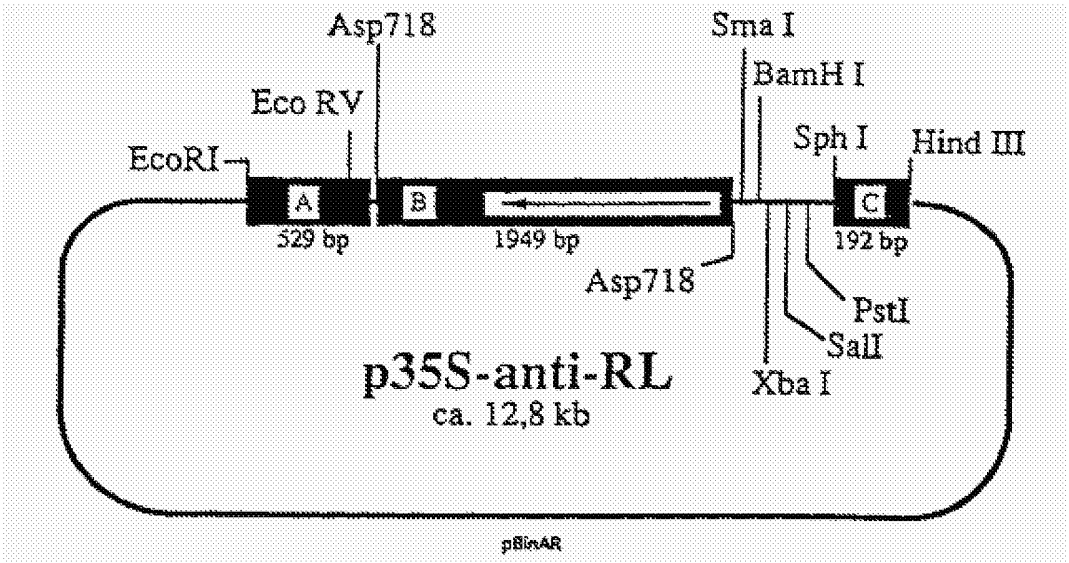
Asp718
Sma I
BamH I
Eco RV
Sph I
Hind III
EcoRI
A
B
C
529 bp
1949 bp
192 bp
Asp718
PstI
SalI
Xba I
p35S-anti-RL
ca. 12,8 kb
pBlmAR

Fig. 1

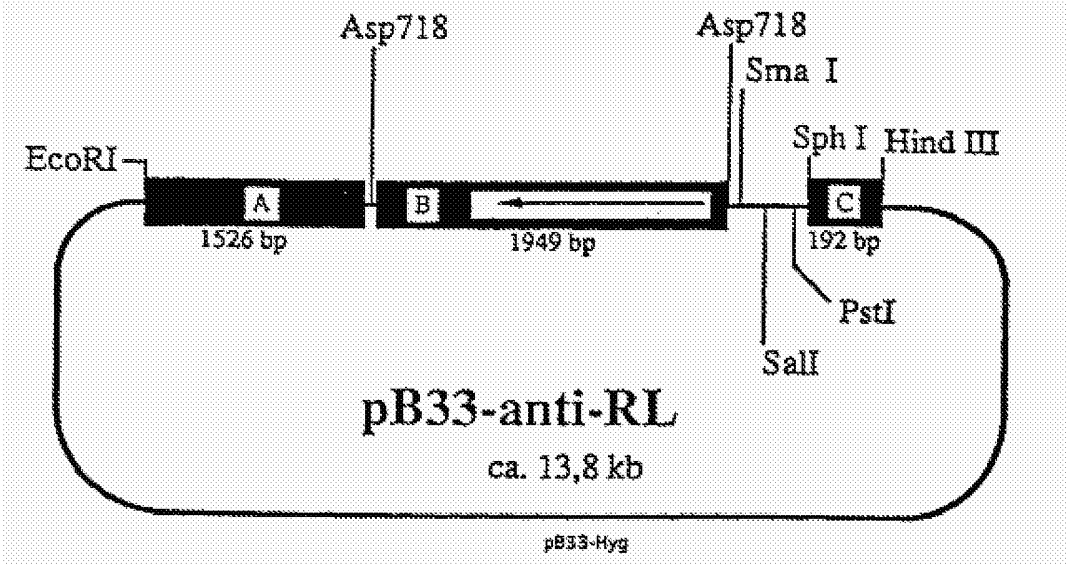
Asp718
Asp718
Sma I
Sph I
Hind III
EcoRI
A
B
C
1526 bp
1949 bp
192 bp
PstI
SalI
pB33-anti-RL
ca. 13,8 kb
pB33-Hyg

Fig. 2

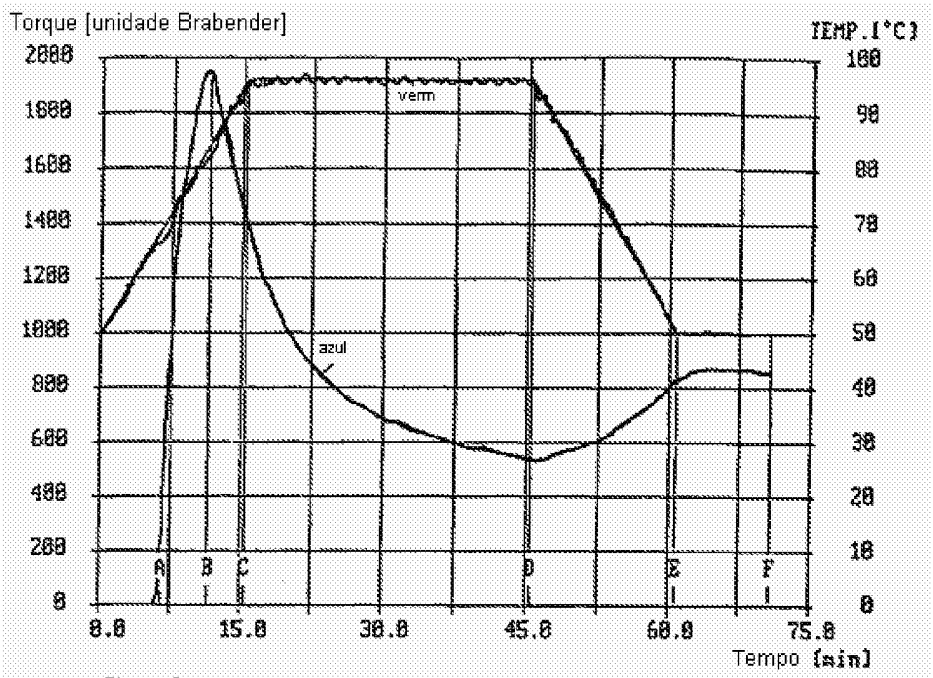

Figura 3

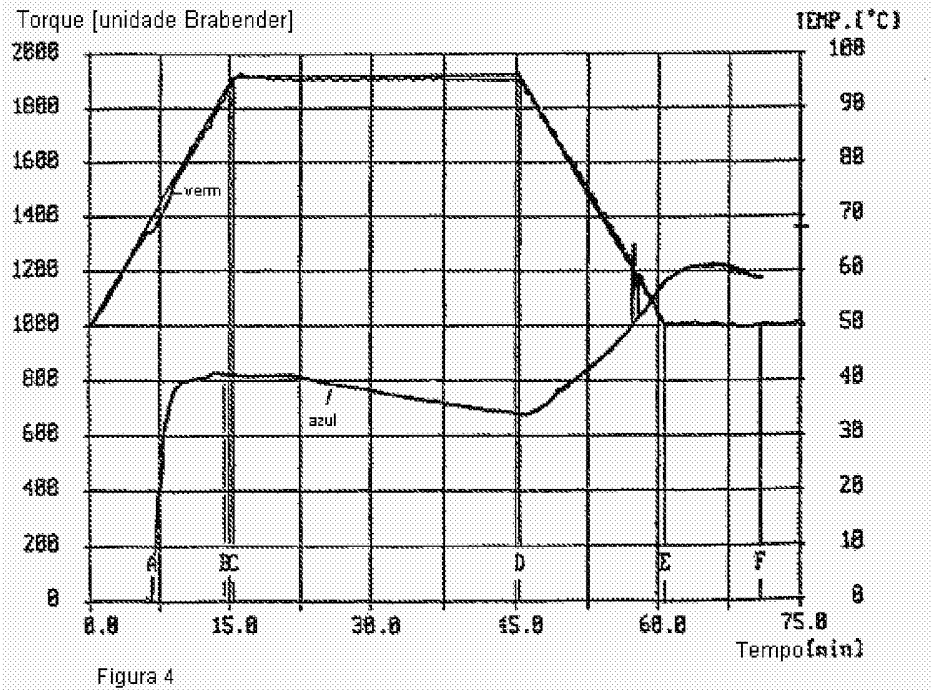

Figura 4

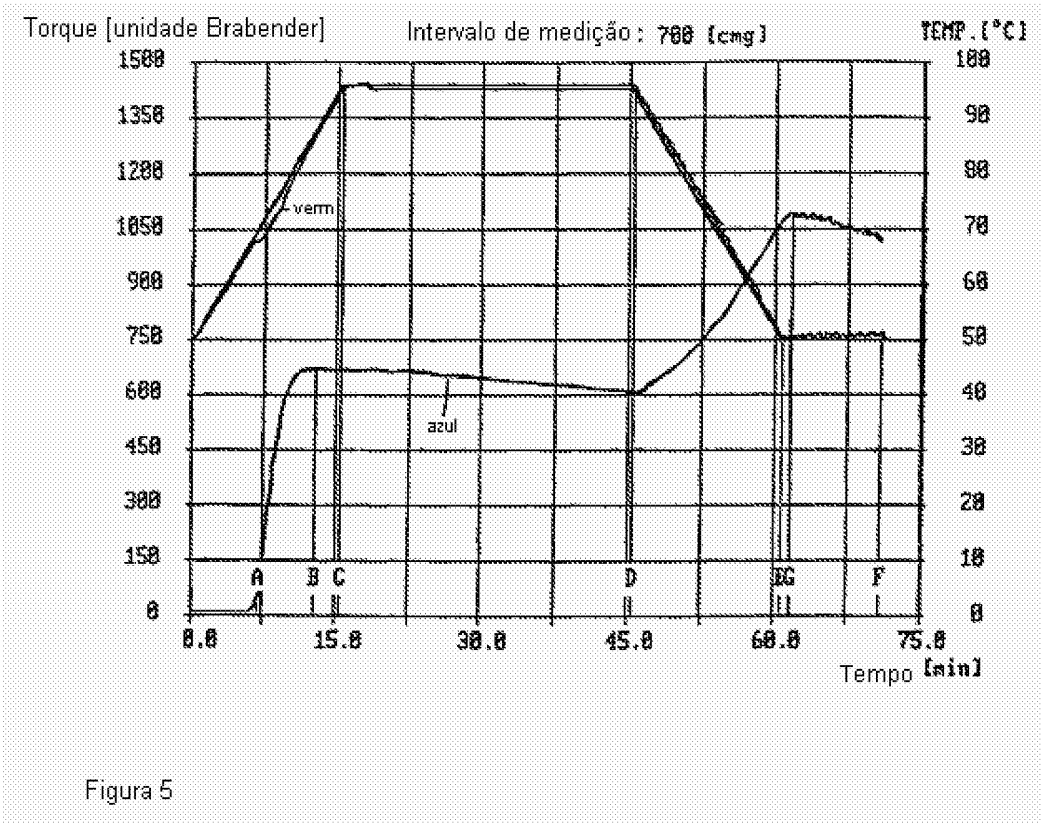
Torque [unidade Brabender]
Intervalo de medição : 700 [cmg]
TEMP.[°C]
1500
1350
1200
1050
900
750
600
450
300
150
0
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
verm
azul
A
B
C
D
EG
F
0.0
15.0
30.0
45.0
60.0
75.0
Tempo [min]

Figura 5

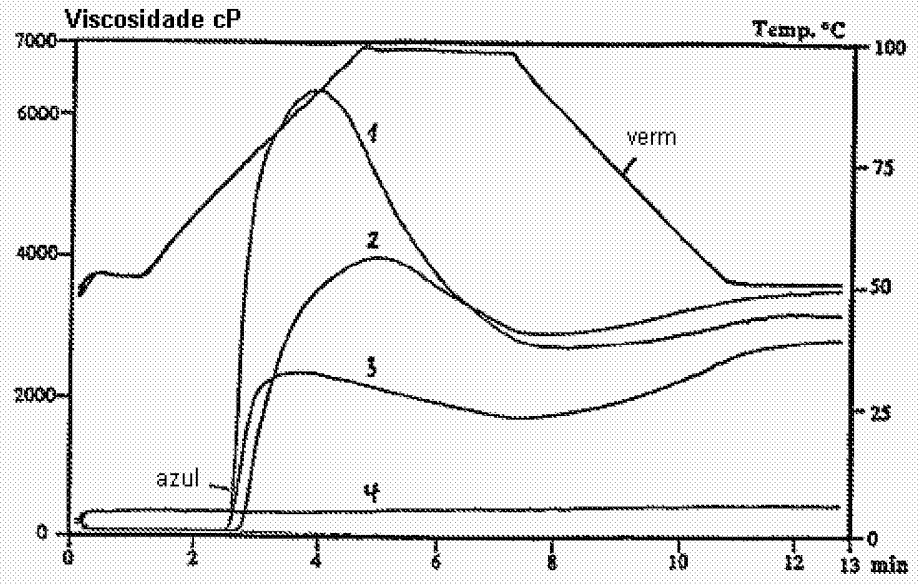

Figura 6

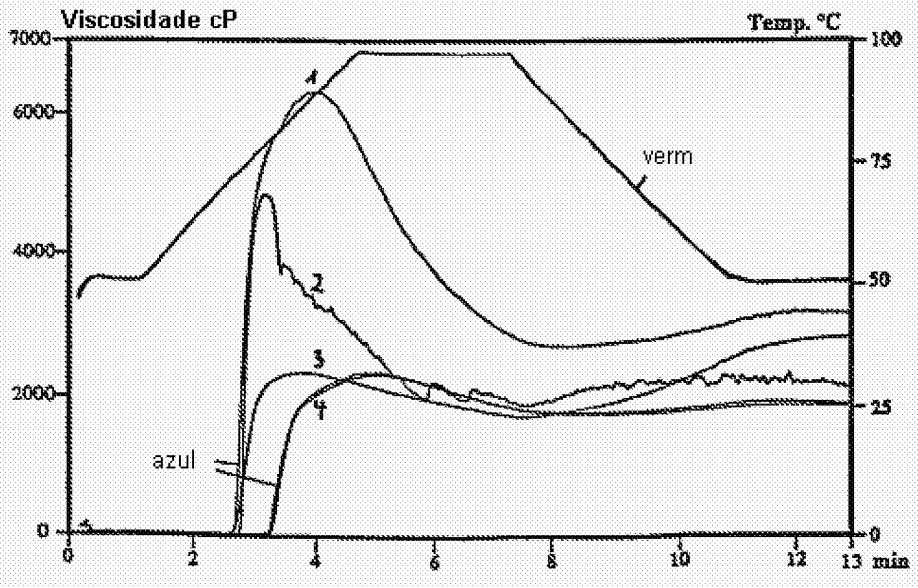

Figura 7