

(11) Número de Publicação: **PT 795018 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/54 (2006.01) **C12N 15/82** (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1996.01.08	(73) Titular(es): PLANT RESEARCH INTERNATIONAL B.V. DROEVENDAALSESTEEG 1 6708 PB WAGENINGEN	NL
(30) Prioridade(s): 1995.01.06 EP 95200015 1995.03.27 EP 95200762	(72) Inventor(es): ARJEN JOHANNES VAN TUNEN INGRID MARIA VAN DER MEER ANDRIES JURRIAN KOOPS	NL NL NL
(43) Data de publicação do pedido: 1997.09.17	(74) Mandatário: LUÍS MANUEL DE ALMADA DA SILVA CARVALHO RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	PT
(45) Data e BPI da concessão: 2007.09.12 148/2007		

(54) Epígrafe: **SEQUÊNCIAS DE ADN CODIFICANDO ENZIMAS DE SÍNTESE DE POLÍMEROS DE HIDRATOS DE CARBONO E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE PLANTAS TRANSGÉNICAS**

(57) Resumo:

RESUMO**“SEQUÊNCIAS DE ADN CODIFICANDO ENZIMAS DE SÍNTESE DE
POLÍMEROS DE HIDRATOS DE CARBONO E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO
DE PLANTAS TRANSGÊNICAS”**

É divulgado um fragmento de ADN possuindo uma sequência nucleotídica SEQ ID NO: 1 tal como mostrada na Figura 4A ou uma sequência homóloga possuindo uma semelhança de pelo menos 70% codificando 1-sacarose:sacarose-frutosiltransferase. É também divulgado um fragmento de ADN possuindo uma sequência nucleotídica SEQ ID NO: 2 tal como mostrada na Figura 4B ou uma sequência homóloga possuindo uma semelhança de pelo menos 70% codificando 1-frutano:frutano-frutosiltransferase. Este invento divulga ainda um ADN recombinante compreendendo um ou mais dos referidos fragmentos de ADN, ou compreendendo o(s) referido(s) fragmento de ADN na orientação inversa. Utilizando os referidos fragmentos podem ser produzidos organismos transformados apresentando um perfil de frutanos modificado.

DESCRIÇÃO**“SEQUÊNCIAS DE ADN CODIFICANDO ENZIMAS DE SÍNTESE DE
POLÍMEROS DE HIDRATOS DE CARBONO E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO
DE PLANTAS TRANSGÊNICAS”**

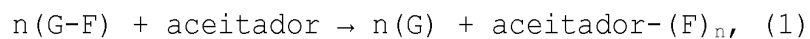
Este invento refere-se a sequências nucleotídicas codificando enzimas de síntese de frutanos, uma sequência de ADN recombinante compreendendo uma ou mais das referidas sequências nucleotídicas, um método para produção de um organismo hospedeiro geneticamente transformado apresentando um perfil de frutanos modificado e plantas ou partes de plantas transformadas apresentando o referido perfil de frutanos modificado.

Os frutanos referem-se a um grupo de compostos hidratos de carbono nos quais uma ou mais ligações frutossil-frutose constituem a maioria das ligações. Os frutanos são polímeros de frutose com habitualmente, mas não necessariamente, uma unidade glicosil terminal $[G-(F)_n]$, $G = \text{opcional}$, $n \geq 2$. As ligações frutossil-frutose nos frutanos são do tipo de ligação β -2,6 ou β -2,1. Os frutanos com ligações frutossil-frutose predominantemente β -2,6 são habitualmente designados levano(s). Os frutanos com ligações frutossil-frutose predominantemente β -2,1 são habitualmente designados inulina(s).

A biossíntese dos frutanos é vulgar em várias famílias de bactérias, fungos e algas e também em famílias específicas de plantas, tais como a Liliaceae (p. ex., *Allium cepa*), Poaceae (p. ex., *Lolium perenne*) e Asteraceae (p. ex., *Helianthus tuberosus*). A função dos frutanos nas bactérias e nos fungos está pouco compreendida. Foi sugerido que os frutanos actuam como reservas extracelulares de hidratos de carbono que podem ser mobilizadas durante períodos de stress de hidratos de carbono (Jacques, 1993). Em plantas, os frutanos podem funcionar como reserva de hidratos de carbono que servem como fonte de carbono para (re)crescimento (Meier and Reid, 1982). Em espécies armazenadoras de frutanos, a síntese de frutanos está restringida não só a órgãos específicos (p. ex., os caules ou tubérculos de *H. tuberosus*, os bolbos de *Allium* spp, as bases das folhas e caules das ervas) como também a tipos celulares específicos dentro destes órgãos (habitualmente as células do parênquima). Nestes tipos celulares específicos, o vacúolo é provavelmente a localização tanto da biossíntese como do armazenamento dos frutanos (Darwen e John, 1989; Wagner et al., 1983).

Nas bactérias, exemplos de bactérias sintetizadoras de frutanos são *Streptococcus mutans* e *Bacillus subtilis*, a biossíntese de frutanos a partir de sacarose é catalisada apenas por uma enzima: levanossacarase (EC 2.4.1.10) em *B. subtilis* (Dedonder 1966) e levanossacarase, mas também designada frutossiltransferase, (FTF, EC

2.4.1.10) em *S. mutans* (Carlsson, 1970). A síntese de frutanos bacterianos prossegue através da transferência directa da frutose de uma sacarose dadora (G-F) para uma sacarose ou outras moléculas aceitadoras de acordo com a seguinte reacção reversível:



onde n pode ser maior que 10000.

A água, hexoses, sacarose, oligossacáridos e levano podem actuar como moléculas aceitadoras de unidades de frutosil da sacarose (dadora de frutosil).

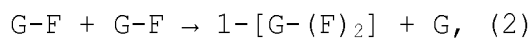
As sequências de ADN bacteriano codificando FTF em *S. mutans* e de levanossacarase in *B. subtilus* estão já descritas na literatura (Sato e Kuramitsu, 1986; Steinmetz et al. 1985). Foram utilizados genes bacterianos de várias fontes para transformar plantas hospedeiras específicas que normalmente não podem sintetizar frutanos, induzindo deste modo a síntese de frutanos (ver por exemplo: Van der Meer et al., 1994; Ebskamp et al., 1994). Um método para aumentar o teor sólido dos frutos do tomateiro, utilizando o gene da levanossacarase de *B. subtilus* e o gene da dextranossacarase de *Leuconostoc mesenteroides* está descrito no pedido WO 89/12386. Um método para modificar o padrão de frutanos em plantas que normalmente não podem sintetizar frutanos, utilizando o gene *ftf* codificando a levanossacarase de *S. mutans* e o gene *SacB* codificando a

levanossacarase de *B. subtilus* está descrito nos pedidos NL A 9300646 e WO 94/14970. A utilização de uma sequência de ADN codificando a levanossacarase de *Erwinia amylovora*, que após integração no genoma da planta hospedeira conduz à síntese de levanos, está descrita em DE 4227061 A1 e WO A 9404692. Em todos os referidos pedidos, são descritas plantas transgênicas que são transformadas com genes de levanossacarase de bactérias. Concordantemente, estas plantas transgênicas sintetizam e acumulam frutanos estruturalmente comparáveis aos sintetizados pelas bactérias dadoras (Van der Meer *et al.*, 1994; Ebskamp *et al.*, 1994).

O presente pedido difere dos referidos pedidos por estar relacionado com sequências de ADN codificando frutossiltransferases derivadas de plantas. Estas enzimas são estruturalmente diferentes das enzimas bacterianas uma vez que não existe uma homologia significativa ao nível dos aminoácidos nem do ADN. Para além disso, o mecanismo de biossíntese dos frutanos em plantas é essencialmente diferente do das bactérias. Em contraste com a biossíntese de frutanos em bactérias, a formação de frutanos em plantas é mediada por mais de uma enzima. Por exemplo, em *Helianthus tuberosus* (girassol-batateiro), a biossíntese de frutanos é catalisada por duas enzimas: a sacarose:sacarose-frutossiltransferase (SST, EC 2.4.1.99) e a frutano:frutano-frutossiltransferase (FFT, EC 2.4.1.100). A SST e a FFT de *H. tuberosus* estão envolvidas na síntese de frutanos ligados em β -2,1 (inulina) e são portanto também designadas como 1-SST e 1-FFT. A 1-FFT foi purificada a

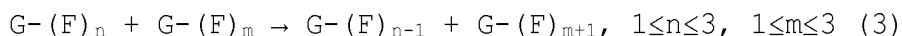
partir de tubérculos de *H. tuberosus* (Lüscher *et al.*, 1993; Koops e Jonker, 1994). A purificação de SST provou-se ser mais difícil de alcançar. Foi purificada uma putativa SST a um rendimento muito baixo, a partir de várias fontes vegetais (Shiomi e Izawa, 1980; Praznik *et al.*, 1990; Angenent *et al.*, 1993). No entanto, em nenhum destes estudos a pureza da enzima foi convincentemente mostrada. Para além disso, não foi convincentemente mostrado nestes estudos que a enzima isolada não representa uma invertase.

Grandes quantidades de 1-SST e 1-FFT foram agora purificadas até à homogeneidade a partir de tubérculos de *H. tuberosus* (1-FFT: Koops e Jonker, 1994) e os seus mecanismos reaccionais foram extensivamente investigados. A 1-SST de *H. tuberosus* catalisa o passo inicial da biossíntese de frutanos, a síntese do trissacárido 1-cestose (1-[G-(F)₂]) a partir de duas moléculas de sacarose (G-F), de acordo com a seguinte reacção:



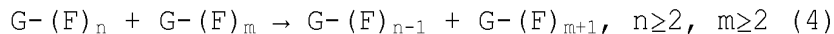
em que G-F = sacarose, -F = unidade frutossil, -G = unidade glucosil, G = glicose

A 1-SST pode também catalisar a formação do tetrassacárido 1,1-[G-(F)₃] e do pentassacárido 1,1,1-[G-(F)₄] (Fig. 3A). Por essa razão, a actividade de 1-SST pode ser descrita pela seguinte reacção geral:



Verificou-se também que a 1-SST de *H. tuberosus* pode até certo ponto catalisar a transferência de uma unidade frutossil de $G-(F)_n$, $1 \leq n \leq 3$, para água.

A segunda enzima, 1-FFT, catalisa a formação de frutanos com um maior grau de polimerização. Esta enzima catalisa uma reacção de polimerização através da transferência de unidades frutossil entre trissacáridos, tetrassacáridos e polímeros de frutose maiores de acordo com a seguinte reacção geral:



Verificou-se também que 1-FFT catalisa a transferência de unidades frutossil entre hidratos de carbono $[(Gal)_n-G-F]$, também designados galactanos, contendo sacarose (G-F) e galactose (Gal). Por exemplo, a 1-FFT pode catalisar a transferência de uma unidade frutossil de $G-(F)_2$ para rafinose (Gal-G-F) o que resulta na formação de $[Gal-G-(F)_2]$. Não se pode excluir que tanto 1-SST como 1-FFT de *H. tuberosus* podem utilizar outros substratos como aceptadores de frutossil.

Embora 1-SST e 1-FFT tenham alguma actividade sobreponível - ambas as enzimas podem catalisar a formação de tetra e pentassacáridos (reacções 3 ou 4) - 1-SST e 1-FFT são enzimas distintamente diferentes. As proteínas

1-SST e 1-FFT têm diferentes propriedades físicas e são codificadas por diferentes genes. 1-SST e 1-FFT têm essencialmente propriedades enzimáticas diferentes. 1-FFT não é capaz de catalisar o passo inicial da síntese de frutanos (reacção 2), enquanto que 1-SST não é capaz de catalisar a formação de polímeros de frutanos com um grau de polimerização superior a 5 [$G-(F)_n$, $n > 4$]. Em conclusão, apenas com a actividade de 1-SST, é apenas possível sintetizar oligofrutanos a partir de sacarose com um grau de polimerização até 5 [$G-(F)_n$, $2 \leq n \leq 4$]. Para sintetizar frutanos com um grau mais elevado de polimerização e utilizando sacarose como substrato, é necessário tanto 1-SST como 1-FFT. Apenas com a actividade de 1-FFT, não é possível sintetizar frutanos a partir de sacarose. Os presentes inventores verificaram que fracções proteicas contendo 1-SST purificada bem como a 1-FFT purificada podiam utilizar sacarose como único substrato para a síntese de frutanos com um grau de polimerização de pelo menos 15 [$G-(F)_{14}$, Fig. 3B].

Os frutanos bacterianos diferem dos frutanos das plantas no grau de polimerização e no tipo de ramificação e, conseqüentemente, nas propriedades químicas e físicas. Em geral, os frutanos das plantas são montados a partir de menos de 1000 unidades frutossil. Os frutanos de *H. tuberosus* são montados a partir de menos de 100 unidades frutossil. Os frutanos sintetizados por bactérias podem compreender mais de 10000 unidades frutossil. Os frutanos vegetais e bacterianos diferem portanto nas suas possíveis aplicações. Para frutanos com um grau relativamente baixo

de polimerização, tal como os isolados de Asteraceae (p. ex., girassol-batateiro, chicória ou dália), foi já feito um pedido como substituto de fosfato em agentes de ligação ao cálcio e detergentes (WO91/17189). Outros pedidos estão relacionados com as propriedades organolépticas dos frutanos. O poder adoçante dos frutanos $G-(F)_n$ diminui com um aumento do grau de polimerização (aumento do valor de n). O poder adoçante dos oligofrutanos $G-(F)_2$ e $G-(F)_3$ aproxima-se do da sacarose ($G-F$). Os frutanos de cadeia muito longa tais como os que ocorrem em bactérias não são nada doces. Os frutanos de cadeia muito curta, tais como os que são sintetizados pela sacarose:sacarose-frutossiltransferase podem por isso ser utilizados como adoçantes com a vantagem adicional de que estes frutanos de sabor doce não são carcinogénicos e podem resistir à digestão no tracto digestivo dos humanos, o que abre possibilidades quanto à utilização como adoçante de baixas calorias. Os frutanos de cadeia curta, e também os frutanos de cadeia mais longa, podem ser utilizados como a porção hidrófoba de biotensioactivos.

Em contraste com os genes bacterianos que codificam levanossacarase, que foram já clonados, os genes codificando SST e FFT ainda não foram isolados das plantas. Verificámos que os genes codificando SST e FFT de plantas, ao nível dos aminoácidos, não têm uma semelhança significativa com as levanossacarases conhecidas e que ao nível do ADN não têm um grau de homologia significativo com os genes de levanossacarases. Por esta razão não foi possível isolar os genes de frutossiltransferases de plantas utilizando sondas heterólogas de levanossacarases. Também não

foi possível isolar os genes codificando SST e FFT a partir de plantas utilizando as sequências de aminoácidos das enzimas SST e FFT purificadas e seus iniciadores oligonucleotídicos deduzidos.

Em relação à enzima SST a razão para isto é que, embora tenham sido descritos métodos para a purificação de frutossiltransferases a partir de plantas, não foi possível até agora obter a enzima SST em quantidades suficientemente grandes e com graus de pureza suficientemente elevados. Em relação à enzima FFT, a sua purificação é conhecida de Koops e Jonker, 1994.

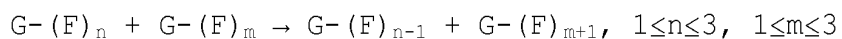
O objectivo deste invento é proporcionar sequências nucleotídicas codificando SST.

Outro objectivo deste invento é proporcionar sequências nucleotídicas, obtidas através de recombinação ou mutagenese de sequências nucleotídicas codificando SST, que codifiquem enzimas possuindo actividade de frutossiltransferase.

Ainda outro objectivo deste invento é proporcionar um método para transformação de espécies não sintetizadoras de frutanos em espécies sintetizadoras de frutanos através da introdução dos genes que codificam SST.

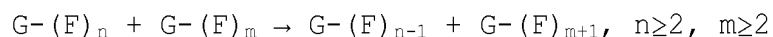
Ainda outro objectivo deste invento é desligar (parcialmente) a síntese de frutanos em espécies que normalmente sintetizam frutanos.

Concordantemente, este invento proporciona um fragmento de ADN possuindo uma sequência nucleotídica SEQ ID NO: 1, tal como mostrada na Fig. 4A, ou uma sequência homóloga possuindo uma identidade de pelo menos 70% codificando uma proteína possuindo actividade de 1-sacarose:sacarose-frutosiltransferase, que catalise a reacção geral:



em que -G representa uma unidade glicosil e -F representa uma unidade frutosil.

Mais, este invento proporciona uma sequência de ADN recombinante compreendendo um ou mais destes fragmentos de ADN. Para além disso, este invento proporciona uma sequência de ADN recombinante compreendendo um ou mais dos fragmentos de ADN acima definidos e compreendendo ainda um fragmento de ADN possuindo uma sequência nucleotídica SEQ ID NO: 2 tal como mostrado na Fig. 4B ou uma sequência homóloga possuindo uma identidade de pelo menos 70% codificando uma proteína possuindo actividade de 1-frutano:frutano-frutosiltransferase, que catalise a reacção geral:



em que -G e -F são tal como definido acima.

A 1-sacarose:sacarose-frutosiltransferase (1-SST) e a 1-frutano:frutano-frutosiltransferase (1-FFT) foram

purificadas a partir de tubérculos de *Helianthus tuberosus*. As enzimas purificadas foram clivadas em péptidos através de digestão triptica e as misturas peptídicas resultantes foram separadas através de HPLC. A sequenciação dos aminoácidos N-terminais foi efectuada para os péptidos seleccionados. As sequências de aminoácidos específicas para 1-SST e 1-FFT foram utilizadas para desenhar iniciadores oligonucleotídicos degenerados específicos para 1-SST e 1-FFT, respectivamente, para utilização em RT-PCR. A PCR foi efectuada utilizando ADNc como molde, um iniciador específico da cauda e iniciadores degenerados específicos para 1-SST ou 1-FFT. O ADNc da primeira cadeia foi sintetizado a partir de ARN poli(A)+ isolado de tubérculos de *H. tuberosus*. Com o iniciador específico de 1-SST, a RT-PCR resultou num fragmento específico de 450 pb. Com o iniciador específico de 1-FFT, a RT-PCR resultou num fragmento específico de 800 pb. Os fragmentos de PCR de 450 e 800 pb foram subsequentemente utilizados para pesquisar uma biblioteca de ADNc feita a partir de tubérculos de *H. tuberosus* para isolar as sequências de ADNc inteiras codificando 1-SST e 1-FFT, respectivamente.

As sequências codificando SST e FFT de plantas do presente invento induzem, após inserção no genoma de um organismo hospedeiro, por exemplo uma planta, alterações nas concentrações de hidratos de carbono contendo pelo menos uma unidade frutossil (sacarose, oligofrutanos, frutanos ou galactanos) ou causam uma alteração no grau de polimerização dos oligofrutanos, frutanos ou galactanos. O

presente invento está relacionado com os referidos hidratos de carbono, uma vez que a sacarose é o substrato para SST, os oligofrutanos são produtos de SST, os oligofrutanos e os frutanos com um grau mais elevado de polimerização são substratos e produtos de FFT. Para além disso as referidas enzimas frutossiltransferases podem também efectuar reacções de transfrutossilacção com galactanos da série rafinose como aceitador de frutossil.

O presente invento inclui sequências de ADN que são pelo menos 70% idênticas à sequência codificando 1-SST de *H. tuberosus*, independentemente de se as sequências homólogas são derivadas de outras fontes vegetais, ou obtidas através de mutagénesse de sequências codificando frutossiltransferases de fontes vegetais ou de microrganismos. É preferível que o grau de homologia seja de pelo menos 80%, de maior preferência que o grau de homologia seja de pelo menos 85%, sendo ainda preferível que o grau de homologia seja de pelo menos 90%. É particularmente preferido que o grau de homologia seja de pelo menos 95%.

O presente invento inclui sequências de ADN que são pelo menos 70% idênticas à sequência codificando 1-FFT de *H. tuberosus*, independentemente de se as sequências homólogas são derivadas de outras fontes vegetais, ou obtidas através de mutagénesse de sequências codificando frutossiltransferases de microrganismos. É preferível que o grau de homologia seja de pelo menos 80%, de maior preferência que o grau de homologia seja de pelo menos 85%,

sendo ainda preferível que o grau de homologia seja de pelo menos 90%. É particularmente mais preferido que o grau de homologia seja de pelo menos 95%.

O presente invento inclui também sequências de ADN obtidas através de recombinação *in vivo* e *in vitro* utilizando sequências codificando SST e opcionalmente FFT de plantas e sequências codificando frutossiltransferases de outras fontes procarióticas ou eucarióticas, incluindo bactérias e fungos.

O presente invento refere-se a sequências de ADN codificando SST de plantas, que após inserção no genoma de um organismo hospedeiro induzem a síntese de oligofrutanos compreendendo 2, 3 e/ou 4 unidades frutossil $[G-(F)_n, 2 \leq n \leq 4]$. O presente invento refere-se também a sequências de ADN codificando FFT de plantas que após inserção no genoma de um organismo hospedeiro juntamente com sequências de ADN codificando SST, induzem a síntese de frutanos com um maior grau de polimerização $[G-(F)_n, n > 4]$.

O presente invento refere-se também a construções génicas quiméricas compreendendo sequências codificando SST e opcionalmente FFT, ou parte das sequências, estando as sequências presentes na direcção anti-sentido. A introdução destas construções anti-sentido em plantas que podem sintetizar frutanos causará inibição das reacções catalisadas por SST ou FFT ou causará inibição da expressão de SST ou FFT.

O presente invento refere-se a construções génicas quiméricas codificando SST, ou parte da sequência, estando a sequência de codificação presente na orientação anti-sentido. A introdução destas construções anti-sentido no genoma de plantas hospedeiras que podem sintetizar frutanos, tais como espécies das famílias Asteraceae, Liliaceae e Poaceae, reduz ou bloqueia a conversão de sacarose em oligofrutanos $[G-(F)_n, 2 \leq n \leq 4]$. Uma vez que apenas SST é capaz de catalisar o primeiro passo da síntese de frutanos (reação 2), em tais plantas transgénicas também a síntese de frutanos com um maior grau de polimerização, $[G-(F)_n, n > 4]$, será reduzida ou bloqueada e estas plantas acumularão sacarose em vez de frutanos.

O presente invento refere-se a construções génicas quiméricas codificando FFT, ou parte da sequência, estando a sequência de codificação presente na orientação anti-sentido. A introdução destas construções anti-sentido no genoma de plantas hospedeiras que podem sintetizar frutanos reduz ou bloqueia a conversão oligofrutanos $[G-(F)_n, 2 \leq n \leq 4]$ em frutanos com um grau de polimerização mais elevado $[G-(F)_n, n > 4]$. As plantas transgénicas assim obtidas acumularão oligofrutanos em vez de frutanos, com um grau de polimerização mais elevado.

De acordo, o presente invento proporciona um método para a produção de uma planta geneticamente transformada apresentando um perfil de frutanos modificado, que compreende os passos de:

i) preparação de uma construção génica quimérica compreendendo um ou mais fragmentos de ADN tal como acima definido ou os referidos fragmentos de ADN na orientação invertida, operativamente ligados a uma sequência promotora activa na referida planta e uma sequência terminadora activa na referida planta,

ii) introdução da construção génica quimérica no genoma da planta, e

iii) regeneração das células vegetais transformadas em plantas transgénicas.

Mais especificamente o método do invento compreende os seguintes passos:

a. construção de um gene quimérico compreendendo essencialmente as seguintes sequências:

- um promotor que assegura a formação de um ARN ou proteína funcional no organismo alvo, órgãos alvo, tecidos ou células pretendidos,

- uma sequência de ADN codificando SST e opcionalmente FFT,

- um terminador da transcrição operativamente ligado à sequência de ADN, estando a sequência de ADN

codificando SST e opcionalmente FFT funcionalmente ligada a um promotor, uma sequência de ADN codificando um sinal de direccionamento ou um péptido de trânsito que assegura o direccionamento de SST e opcionalmente FFT para um compartimento subcelular específico;

b. introdução do gene quimérico no genoma de um organismo hospedeiro de modo a obter material genético compreendendo a sequência de ADN e

c. regeneração do material genético num organismo hospedeiro transformado.

No ADN recombinante do presente invento, a sequência de ADN codificando SST e opcionalmente FFT está de preferência ligada a uma sequência reguladora que assegura a expressão correcta da sequência de ADN num organismo hospedeiro, tal como uma bactéria, uma levedura, uma alga ou uma planta, a um nível de expressão suficientemente elevado. As sequências reguladoras são um promotor, um sinal de terminação e um estimulador da transcrição ou da tradução. Um promotor pode ser o promotor de 35S do vírus do mosaico do tabaco (CaMV) ou um promotor indutível por açúcar semelhante ao promotor da patatina ou um promotor específico de um órgão semelhante ao promotor do inibidor II da proteinase de batata específico do tubérculo ou qualquer outro promotor indutível ou específico de tecido.

No ADN recombinante do presente invento, a sequência de ADN codificando SST e opcionalmente FFT está de preferência ligada a sequências reguladoras que são operativas em plantas e que asseguram uma expressão correcta da sequência de ADN nos diferentes órgãos, tecidos ou células da planta. Um promotor altamente preferido é um promotor que é activo em órgãos e tipos celulares que normalmente acumulam sacarose (o substrato primário para a síntese de frutanos). A produção de frutanos é particularmente vantajosa em órgãos que armazenam grandes quantidades de sacarose, tais como as raízes apumadas da beterraba sacarina ou os caules da cana do açúcar. Para além das raízes, estão envolvidos outros órgãos ou tipos celulares na síntese, processamento, transporte e acumulação de sacarose. Portanto, as sequências codificando SST ou FFT são também adequadamente expressas em folhas, caules, raízes, tubérculos, órgãos reprodutores e sementes.

No ADN recombinante do presente invento, a sequência de ADN codificando SST e opcionalmente FFT contém ou está ligada a uma sequência codificando um péptido de trânsito que dirige a proteína madura SST e opcionalmente a FFT para um compartimento subcelular contendo sacarose. A produção de frutanos é particularmente vantajosa no vacúolo que pode acumular concentrações muito elevadas de sacarose (até 900 mol m^{-3}). Para além do vacúolo, outros compartimentos subcelulares estão envolvidos na síntese (citoplasma), processamento (citoplasma, mitocôndrias, plastos) e transporte (parede celular, citoplasma) da

sacarose. O presente invento refere-se portanto à utilização de sequências que permitem o direcionamento do produto SST e opcionalmente FFT para compartimentos subcelulares específicos, tais como o vacúolo, a parede celular, as mitocôndrias, os plastos e o citoplasma.

O presente invento refere-se também a construções génicas, compreendendo uma sequência codificando SST e opcionalmente FFT, ou parte das sequências, estando a sequência de codificação presente na orientação anti-sentido. Nestas construções génicas, a sequência codificando SST e opcionalmente FFT está de preferência ligada a um promotor que assegura a formação de um ARN anti-sentido nos tipos celulares que eram normalmente capazes de sintetizar frutanos.

Os ADNs recombinantes do presente invento podem também codificar proteínas possuindo resistência a herbicidas, propriedades de promoção do crescimento vegetal, inibição do crescimento vegetal, antifúngicas, antibacterianas, antivirais e/ou anti-nemátodes ou que confirmam resistência ao stress. Os ADNs recombinantes do presente invento podem ainda codificar proteínas que induzam esterilidade. No caso de se pretender introduzir o ADN num organismo heterólogo este pode ser modificado para remover motivos conhecidos de instabilidade do ARNm (tais como regiões ricas em AT); e são utilizados sinais de poliadenação e/ou códons que sejam preferidos pelo organismo, no qual se pretender inserir o ADN recombinante, de modo a que a expressão do ADN assim modificado no organismo

hospedeiro seja maior que a obtida através da expressão de ADN recombinante não modificado no mesmo organismo hospedeiro.

O presente invento proporciona também uma planta transformada mostrando um perfil de frutanos modificado ou uma célula vegetal, semente, fruto, plântula ou qualquer parte da planta transformada, ancorando uma construção génica quimérica compreendendo um ou mais fragmentos de ADN tais como acima definidos ou os referidos fragmentos de ADN na orientação inversa, operativamente ligados a uma sequência promotora activa na referida planta e a uma sequência terminadora activa na referida planta. O invento inclui de preferência colheitas agrícolas, de forragem, legumes, ornamentais e de fruto, de maior preferência beterraba sacarina, cana do açúcar, batata, petúnia, alfafa, soja, arroz, azevém, rabo-de-gato, trigo, cevada, sorgo, milho, chicória, girassol-batateiro, tília, melão, cebola, alho, tomate, morango, maçã e pêra. Mais, este invento inclui a descendência das plantas transformadas que contenham o ADN estavelmente incorporado e transmissível de forma Mendeliana e/ou as sementes de tais plantas e tal descendência.

PARTE EXPERIMENTAL

Purificação de 1-SST

Tubérculos de *Helianthus tuberosus* "Colombia" foram utilizados para a extracção de 1-SST e 1-FFT. Os tubérculos foram colhidos em Agosto-Setembro, durante o

período de crescimento rápido dos tubérculos e de acumulação massiva de frutanos. Os tubérculos foram lavados e congelados em azoto líquido. Quatrocentos gramas de tubérculos congelados (-80°C) foram pulverizados e imediatamente homogeneizados a partir daí num misturador Waring em 900 cm^3 de tampão fosfato (P) 50 mol m^{-3} , pH 6,5, contendo glicerol a 10% (p/v), MgSO_4 1 mol m^{-3} , Na_2EDTA 1 mol m^{-3} , PMSF 1 mol m^{-3} (Sigma, USA), DTT 1 mol m^{-3} , PVPP 1,5% (w/v) e $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 20 mol m^{-3} . O homogenato foi filtrado através de três camadas de Miracloth e centrifugado a 17000 g durante 1 h.

O extracto proteico foi mantido a 4°C e ajustado a uma saturação de 45% com $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$. As proteínas insolúveis foram sedimentadas através de centrifugação (10000 g , 30 min) e descartadas. O sobrenadante a 45% foi levado até 70% de saturação através de mais adições de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O sedimento, obtido após um segundo passo de centrifugação, foi novamente dissolvido em 60 cm^3 de tampão fosfato (P) 50 mol m^{-3} , pH 6,5, DTT 1 mol m^{-3} e PMSF (Sigma, USA) 1 mol m^{-3} , e dessalinizado através de diálise contra tampão-P 10 mol m^{-3} , pH 6,5, PMSF 1 mol m^{-3} e DTT 1 mol m^{-3} , durante 16 h. Após substituição do tampão a diálise foi continuada durante mais 3 h. Todo o procedimento foi efectuado a temperaturas entre 0 e 4°C . O dialisado centrifugado (30000 g , 30 min) foi aplicado sobre uma coluna de Fluxo Rápido de Sepharose Q de $25\times 120\text{ mm}$ (4°C), que tinha sido pré-lavada com bis-Tris 10 mol m^{-3} , pH 6,5, DTT 1 mol m^{-3} , PMSF 1 mol m^{-3} e EDTA 5 mol m^{-3} em água Milli-Q. As proteínas ligadas

foram eluídas com um gradiente de NaCl (0-300 mol m⁻³) no mesmo tampão a um caudal de 5 cm³ min⁻¹. A 1-SST eluiu a NaCl 200-250 mol m⁻³.

As fracções de Sepharose Q foram ajustadas a 400 mol m⁻³ com (NH₂)₂SO₄ sólido. Fracções de 20 cm³ foram carregadas numa coluna de 15×50 mm de Alta resolução de Fenil-Sepharose ou de Alta Substituição de Fenil-Sepharose, que foram pré-equilibradas com tampão bis-Tris 10 mol m⁻³, pH 6,5, contendo (NH₄)₂SO₄ 500 mol m⁻³, DTT 1 mol m⁻³, PMSF 1 mol m⁻³, EDTA 2 mol m⁻³ e CHAPS (tampão A) a 0,1% a 12°C. A eluição das proteínas ligadas foi realizada utilizando um gradiente linear de tampão A (100-0%) sem (NH₄)₂SO₄, contendo etilglicol a 25% (v/v), a um caudal de 1 cm³ min⁻¹. A 1-SST eluiu a (NH₄)₂SO₄ 100 mol m⁻³.

Fracções de Fenil-Sepharose até 10 cm³ foram injectadas numa coluna de Concanavalina A-Sepharose de 5×50 mm, pré-lavada em bis-Tris 20 mol m⁻³, pH 6,5, NaCl 250 mol m⁻³, CaCl₂ 0,5 mol m⁻³, MnCl₂ 0,5 mol m⁻³, DTT 1 mol m⁻³ e PMSF 1 mol m⁻³. A 1-SST ligada foi eluída com α-CH₃-manopiranosídeo 500 mol m⁻³ no mesmo tampão.

As fracções activas de uma corrida em Concanavalina A foram reunidas e aplicadas numa coluna 5×200 empacotada com hidroxilapatite esférica (15 μm) (Merck, Alemanha). A coluna foi pré-equilibrada em CaCl₂ 2 mol m⁻³, NaCl 10 mol m⁻³, DTT 1 mol m⁻³, PMSF 1 mol m⁻³ e CHAPS (tampão A) a 0,1%. As proteínas ligadas à coluna foram

eluídas com um gradiente em degraus de tampão A e tampão fosfato de potássio 500 mol m^{-3} , pH 6,5, a um caudal de $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. A 1-SST eluiu a fosfato de potássio $75-100 \text{ mol m}^{-3}$.

As fracções activas de uma corrida em hidroxilapatite foram reunidas e aplicadas numa coluna Mono Q de $5 \times 50 \text{ mm}$ que foi pré-equilibrada com tampão-P 10 mol m^{-3} , pH 6,5, DTT 1 mol m^{-3} , EDTA 1 mol m^{-3} e CHAPS a 0,1%. As proteínas ligadas foram eluídas com um gradiente de NaCl ($0-500 \text{ mol m}^{-3}$) a um caudal de $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. A 1-SST eluiu a NaCl 250 mol m^{-3} .

Todas as colunas, empacotamentos de coluna e equipamento de cromatografia foram obtidos em Pharmacia (Suécia), a menos que indicado em contrário.

Purificação de 1-FFT

Foi obtido um extracto bruto de proteínas a partir de tubérculos de *H. tuberosus* tal como descrito para a purificação de 1-SST. O sobrenadante do extracto bruto de proteínas, tal como obtido após centrifugação foi ajustado a uma saturação de 45% com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e agitado durante 1 h. As proteínas insolúveis foram sedimentadas através de centrifugação a 10000 g durante 30 min. O sedimento foi novamente dissolvido em 60 cm^3 de tampão-P 50 mol m^{-3} , pH 6,5, DTT 1 mol m^{-3} e PMSF 1 mol m^{-3} , e dialisado de um dia para o outro contra tampão citrato/fosfato (C/P) 10 mol m^{-3} , pH 4,5, contendo PMSF 1 mol m^{-3} e DTT 1 mol m^{-3} . O conteúdo das tubagens de diálise foi reajustado para pH 6,5

com Na_2HPO_4 0,2 M e as proteínas insolúveis foram removidas através de centrifugação a 30000 g durante 1 h. O sobrenadante foi carregado numa coluna de 25×120 mm de fluxo rápido de Sepharose Q (Pharmacia) pré-equilibrada com tampão-P 10 mol m^{-3} , pH 6,5, DTT 1 mol m^{-3} e PMSF 1 mol m^{-3} em água Milli-Q (Millipore B.V., Holanda). A coluna foi arrefecida para 4°C. As proteínas ligadas foram eluídas com um gradiente positivo de NaCl a um caudal de 5 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$. A 1-FFT eluiu a NaCl 200-250 mol m^{-3} .

Foi adicionado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido às fracções de Sepharose Q para dar uma concentração final de 750 mol m^{-3} . As fracções de 5 cm^3 foram carregadas numa coluna de 15×50 mm de Elevada Resolução de Fenil-Sepharose (Pharmacia) pré-equilibrada com tampão-P 10 mol m^{-3} , pH 6,5, contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 750 mol m^{-3} e DTT 1 mol m^{-3} . As proteínas ligadas foram eluídas com um gradiente negativo de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a um caudal de 1 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ a 12°C. A 1-FFT eluiu a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 450-400 mol m^{-3} .

As fracções de Fenil-Sepharose (até 4 cm^3) foram injectadas numa coluna Hiload 16×600 mm Superdex 75 preparativa (Pharmacia) pré-lavada em tampão-P 10 mol m^{-3} , pH 6,5, e DTT 1 mol m^{-3} . As proteínas foram eluídas no mesmo tampão a um caudal de 0,5 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ a 20°C. A 1-FFT eluiu 95-105 min após a injeccção.

Ensaaios de 1-FFT e 1-SST

A actividade de 1-FFT das fracções da coluna foi rotineiramente ensaiada a 35°C. Alíquotas de 25 mm^3 foram

misturadas com 25 mm³, 0,3 g de Neosugar P (Meiji Seika Kaisha, Ltd, Tokyo, Japão; Neosugar consiste em 1% de hexoses, 4% de sacarose, 42% de G-(F)₂, 44% de G-(F)₃ e 7% de G-(F)₄) por cm³ de tampão-C/P 100 mol m⁻³, pH 6,5. Após 3 h, a reacção foi parada fervendo a mistura de incubação num banho-maria durante 5 min. Um ganho líquido de GF₄ foi tomado como medida da actividade de 1-FFT.

Para a actividade de 1-SST, foram misturadas fracções de 15 mm³ da coluna com 15 mm³ de GF 500 mol m⁻³ em tampão-C/P 100 mol m⁻³, pH 5,0 e incubou-se durante 3 h a 35°C. A síntese de GF₂ foi tomada como medida da actividade de 1-SST.

Análise de açúcares e frutanos

A sacarose e os oligofrutanos foram analisados através de RP-HPLC utilizando uma coluna Speri-5 RP 18 de 2,1×220 mm (Brownlee Labs, Santa Clara, USA). Foi utilizada água Milli-Q como eluente a um caudal de 0,3 cm³ min⁻¹ a 37°C. A glicose e a frutose foram quantificadas numa coluna Shodex SC-1011 6,5×300 mm (Millipore B.V., Waters Chromatography Division, Holanda) corrida a 85°C com água Milli-Q a 0,75 cm³ min⁻¹. Os açúcares foram detectados com um detector do índice de refacção 2142 (RID, Pharmacia). A identificação dos oligofrutanos foi feita através da comparação dos seus tempos de retenção com os dos oligofrutanos purificados a partir de Neosugar P ou de *H. tuberosus* e através das razões glicose/frutose de cada oligofrutano (Koops e Jonker, 1994).

As análises de HPAEC dos oligofrutanos e frutanos com um grau mais elevado de polimerização foram efectuadas num cromatógrafo iónico Dionex Series 4000 equipado com uma coluna de permuta aniónica CarboPac PA1 de 250×4 mm e uma coluna de guarda CarboPac PA de 25×3 mm. Os frutanos foram separados com um gradiente linear de 60 min de 0,25 a 0,4 mol m⁻³ de NaAc em NaOH 0,1 mol m⁻³ a um caudal de 1 ml min⁻¹. A detecção foi feita através de amperometria pulsada (PAD) com um eléctrodo de ouro. O potencial aplicado de um pulso foi mantido a 0,1, 0,6 e -0,6 V durante 0,5, 0,1 e 0,05 segundos, respectivamente. A ramnose foi utilizada como padrão interno. Os frutanos foram identificados através de comparação dos seus tempos de retenção com os dos padrões de frutanos isolados e purificados a partir de *H. tuberosus* de acordo com o método de Heinze e Praznik (1991).

Sequenciação dos aminoácidos de 1-SST e 1-FFT

As fracções de Mono Q de 1-SST ou as fracções de Superdex 75 de 1-FFT foram dessalinizadas e concentradas através de centrifugação em dispositivos de ultrafiltração Centricon-10 (2 cm³) (Grace B.V., Amicon division, Holanda) e subsequentemente recolhidas através de precipitação em acetona aquosa a 80% (v/v) a -20°C. 1-SST e 1-FFT (50 µg de cada) foram dissolvidas em tampão SDS (Laemmli, 1970) e separadas num ExcelGel SDS pré-polimerizado, gradiente 8-18. As proteínas foram coradas com Azul Brilhante de Coomassie de acordo com Rosenfeld et al. (1992). A 1-SST

corada (2 bandas; devido à sua instabilidade intrínseca a 1-SST é clivada através do tratamento com SDS) e as bandas de 1-FFT foram excisadas com um bisturi e lavadas, secas e parcialmente re-hidratadas de acordo com o procedimento de Rosenfeld *et al.* (1992). Foi adicionada tripsina com qualidade para sequenciação (0,5 µg; Boehringer, Alemanha) à fatia de gel e a digestão no gel das proteínas foi realizada durante 4 h a 30°C. Os péptidos resultantes foram recuperados através de duas extracções de 20 minutos cada, com 50 µl de acetonitrilo, água, ácido trifluoroacético e Tween 20 (60:40:0,001:0,0002, v/v). A mistura peptídica resultante foi separada através de RP-HPLC preparativa numa coluna SuperPac Pep-S de 9,3×250 mm (Pharmacia) eluída com um gradiente linear de TFA a 0,1% em acetonitrilo aquoso a 0 a 60% a um caudal de 4 ml min⁻¹. As fracções peptídicas individuais foram colhidas manualmente e armazenadas a -80°C. As sequências de aminoácidos dos péptidos seleccionados foram determinadas através de degradação de Edman, utilizando um sequenciador de pulsos líquidos modelo 477A, ligado em linha a uma unidade de RP-HPLC modelo 120A (Applied Biosystems). As sequências de aminoácidos específicas para 1-SST ou FFT foram traduzidas nas sequências de ADN degeneradas correspondentes (Exemplo 1, Tabela 1), que, por sua vez, foram utilizadas como iniciadores para PCR.

Metodologia de ADN

O isolamento de ADN e ARN, a subclonagem, a análise de restrição e a sequenciação foram efectuados uti-

lizando métodos padrão descritos em manuais de biologia molecular (Sambrook et al. 1989; Ausubel et al. 1994).

Síntese de ADNc

ARN poli(A)⁺ foi isolado a partir de tubérculos de *H. tuberosus* "Colombia". O ADNc de cadeia simples foi sintetizado através de transcriptase reversa a partir de 10 µg de ARN poli(A)⁺ iniciando o ARN poli(A)⁺ com o seguinte iniciador específico da cauda:

5'-CCGAATTCAATACGACTCACTATAGCG(T)₁₅-3'.

PCR

Os oligonucleótidos degenerados específicos para 1-SST ou 1-FFT e o iniciador específico da cauda, 5'-CCGAATTCAATACGACTCACTATAGCG-3' foram utilizados para amplificação do ADNc de cadeia simples. A PCR foi efectuada em 50 µl de tampão de PCR (Life Technologies), contendo 100 pmol de ADNc molde, 100 pmol do iniciador específico da cauda e 100 pmol dos iniciadores específicos para 1-SST ou 1-FFT. A amplificação envolveu 30 ciclos de desnaturação (1 min, 92°C), ligação (1 min, 42°C) e amplificação (1 min, 72°C). Os fragmentos resultantes foram sujeitos a electroforese em agarose a 0,7%, excisados do gel, isolados da matriz de agarose e subclonados no vector pMOSBlue (Amersham). Os fragmentos específicos de 1-SST e 1-FFT gerados através de PCR foram utilizados para pesquisar uma biblioteca de ADNc Uni-ZAP XR.

Construção e pesquisa de uma biblioteca de ADNc

10 µg de ARN poli(A)⁺ isolado a partir de tubérculos de *H. tuberosus* "Colombia" foram utilizados como material de partida para a construção de uma biblioteca de ADNc Uni-ZAP XR (Stratagene). A construção, plaqueamento e pesquisa da biblioteca foram efectuados de acordo com os protocolos desenvolvidos por Stratagene (La Jolla, California, cat. n° 237211). As sondas de ADN marcadas com ³²P específicas para 1-SST ou 1-FFT foram preparadas através de iniciação com oligonucleótidos aleatórios para pesquisar cerca de 100000 placas. A hibridação e lavagem da membrana Hybond-N foram efectuadas sob condições de elevado rigor (hibridação a 65°C, passo final de lavagem com SSC 0,1×, SDS a 0,1%, 65°C). Os clones positivos foram purificados, os fagomídeos pBluescript excisados do vector Uni-ZAP utilizando o sistema Exassist/Solr (Stratagene) e as inserções analisadas através de análise com enzimas de restrição, hibridação e sequenciação.

Análise das plantas transgênicas*Análise de açúcares e frutanos*

50 mg de tecido foliar foi congelado em N₂ líquido e homogeneizado em 0,1 cm³ de água Milli-Q num tubo Eppendorf. O homogenato foi aquecido a 90°C durante 5 min, depois centrifugado a 14000 g durante 10 min. O sobrena-

dante transparente foi analisado através de TLC: 2 μ l do sobrenadante foram colocados numa placa de sílica-gel G 1500 (Schleicher & Schuell). As placas TLC foram reveladas duas vezes com acetona, água (9:1, v/v), ou butan-1-ol, propan-2-ol e água (3:12:4, v/v). Os hidratos de carbono foram visualizados através de vaporização das placas TLC com ureia-ácido fosfórico (Wise et al., 1955).

Ensaio de 1-FFT

Tecido foliar (50 mg) foi congelado em N₂ líquido e homogeneizado num tubo Eppendorf em 0,1 cm³ de tampão fosfato (P) 25 mol m⁻³, pH 6,5, contendo, MgSO₄ 2 mol m⁻³, Na₂EDTA 2 mol m⁻³, PMSF 2 mol m⁻³ (Sigma, USA), DTT 2 mol m⁻³, PVPP solúvel a 1,5% (p/v) (Merck) e Na₂S₂O₅ 20 mol m⁻³. O homogenato foi centrifugado a 14000 g durante 10 min a 4°C. O sobrenadante transparente foi utilizado para o ensaio de 1-FFT. Foram misturados 50 μ l do sobrenadante com 50 μ l de uma mistura de ensaio, contendo G-(F)₃ 2 mol m⁻³, G-(F)₄ 80 mol m⁻³, tampão citrato/fosfato 50 mol m⁻³, pH 5,5 e NaN₃ 0,02% (p/v). A mistura de ensaio foi incubada no escuro a 28°C. Foram tomadas amostras de 15 μ l após 4, 20, 44 e 68 h de incubação e analisadas através de TLC.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Purificação da sacarose:sacarose-frutossiltransferase (1-SST) e da frutano-frutossiltransferase (1-FFT), e isolamento dos ADNcs codificando 1-SST e 1-FFT

A 1-SST e a 1-FFT foram purificadas a partir de tubérculos de *Helianthus tuberosus* utilizando técnicas de precipitação, vários procedimentos sucessivos de cromatografia e electroforese. As fracções com actividade de 1-SST, que eluíram da coluna Mono Q deram uma banda após PAGE nativo. A 1-SST é clivada por SDS, portanto a análise através de SDS-PAGE produziu duas bandas de 27 e 55 kDa (Fig. 1, pista 2). As fracções com actividade de 1-FFT que eluíram da coluna de permeação em gel Superdex 75 deram em SDS-PAGE uma banda com um peso molecular estimado de 70 kDa (Fig. 1, pista 3). A 1-SST sozinha foi capaz de sintetizar oligofrutos a partir de sacarose como único substrato (Fig. 3A, 80 h de incubação). Através da recombinação de 1-SST purificada com 1-FFT purificada, a sacarose pôde ser convertida em frutos com um grau de polimerização de pelo menos 15 [G-(F)₁₄, Fig. 3B, 80 h de incubação].

Para a sequenciação de aminoácidos através do método de degradação de Edman (fenilisotiocianato), as bandas proteicas de 27 kDa (1-SST), 55 kDa (1-SST) e 70 kDa (1-FFT) foram excisadas do gel de SDS-PAGE e sujeitas a digestão proteolítica através de tripsina. As misturas peptídicas resultantes foram separadas através de RP-HPLC em corridas separadas (Figs. 2A-C). Os péptidos que eluíram após 26 min e 37 min (ambos do fragmento de 25 kDa de 1-SST, Fig. 2A), 27 min, 34 min e 37 min (do fragmento de 55 kDa de 1-SST, Fig. 2B), 28 min e 32 min (de 1-FFT, Fig. 2C, a fracção que eluiu a 32 min continha os péptidos 7 e 8) foram recolhidos manualmente e sujeitos a sequenciação dos aminoácidos N-terminais (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências de aminoácidos de péptidos seleccionados obtidos após digestão com tripsina de 1-SST (polipéptidos de 25 e 55 kDa) e 1-FFT, e separação das misturas peptídicas resultantes através de RP-HPLC.

Proteína	Sequência de aminoácidos	Sequência de ADN do iniciador de PCR
1 1-SST 0,25 kDa	ADVLF??TTSEGSVAR	
2 idem	EQLPVYFYIAK	5' - GARCARYTNCCNGTNTAYTTYTAYATH GCNAAR-3'
3 1-SST 0,55 kDa	VVLDLETK	
4 idem	FRDPSTLWL?PDGEY	
5 idem	GWANIL	
6 1-FFT	GWATVYNVGR	5' -GGNTGGGCNACNGTNTAYAAY-3'
7 idem	LLVDHSIVEGFAQGG	5' -ATHGTNGARGGNTTYGCNCAR-3'
6 idem	VGESDS	

As sequências de aminoácidos 2 (1-SST, 25 kDa), 6 e 7 (1-FFT) foram utilizadas para desenhar iniciadores de ADN específicos para 1-SST ou 1-FFT que foram utilizados para PCR. A PCR que utilizou os iniciadores 2, 6 ou 7 produziu ADN de cerca de 450, 800 pb e 300 pb, respectivamente. PCR interna ("nested"), utilizando o oligonucleótido 7 como iniciador específico e o fragmento de PCR de 800 pb como molde, produziu novamente o fragmento de PCR de 300 pb o que indicou que o fragmento de 300 pb está incluído no fragmento de 800 pb.

Uma biblioteca de ADNc Uni-ZAP construída a partir de tubérculos de *H. tuberosus* foi pesquisada com o fragmento de 450 pb de 1-SST ou o fragmento de 800 pb de 1-FFT. A pesquisa de cerca de 100000 clones de ADNc produziu cerca de 20 clones positivos que hibridaram com o fragmento de 450 pb e 5 clones que hibridaram com o fragmento de 800 pb. O ADN dos clones que hibridaram com o fragmento de 450 pb não hibridou com o fragmento de 800 pb e *vice-versa*. Os clones positivos foram purificados, os fagomídeos pBlue-script excisados do vector uni-ZAP e a inserção caracterizada através de análise com enzimas de restrição, hibridação e sequenciação.

As sequências de ADN de 1-SST e 1-FFT e suas sequências de aminoácidos correspondentes são apresentadas na Fig. 4A e Fig. 4B, respectivamente. A Sequência ID NO: 1, codificando 1-SST, tem um enquadramento de leitura aberto de 1800 pares de bases e codifica uma proteína de 630 resíduos de aminoácidos. Ao nível do ADN, a 1-SST mostra uma identidade de 68% com o ADNc da β -frutofuranosidase ácida solúvel (= invertase ácida) de cenoura (*Daucus carota*). Ao nível dos aminoácidos, a 1-SST apresenta uma semelhança de 66% com a β -frutofuranosidase ácida solúvel de cenoura.

A Sequência ID NO: 2, codificando 1-FFT, possui um enquadramento de leitura aberto de 1845 pares de bases e codifica uma proteína de 615 aminoácidos e um peso molecular de cerca de 69 kDa. Isto corresponde ao peso

molecular da proteína 1-FFT purificada tal como estabelecido através de SDS-PAGE (Koops e Jonker, 1994). Ao nível do ADN, a 1-FFT apresenta uma identidade de 65% com o ADN da β -frutofuranosidase ácida solúvel (= invertase ácida) de cenoura. Ao nível dos aminoácidos, a 1-FFT apresenta uma semelhança de 60% com a β -frutofuranosidase ácida solúvel de cenoura.

Embora a 1-SST e a 1-FFT tenham um grau relativamente elevado de homologia com a invertase ácida mostrou-se que a 1-SST ou a 1-FFT e a invertase são enzimas distintamente diferentes. Mostrou-se que a 1-SST e a 1-FFT são incapazes de catalisar a hidrólise da sacarose (actividade de invertase). A actividade hidrolítica da 1-SST e 1-FFT purificadas contra a sacarose foi testada num intervalo de pH e de concentrações de sacarose. Não houve actividade de invertase significativa sob nenhuma destas condições (Koops e Jonker, 1994). Não foi observada qualquer homologia superior a 68% entre a sequência de ADN codificando 1-SST e qualquer sequência de ADN conhecida nas bases de dados de sequências nucleotídicas PDB, GENBANK, actualizações de GENBANK, EMBL e actualizações de EMBL. Não se observou uma homologia superior a 65% para a sequência de ADN codificando 1-FFT com qualquer sequência de ADN conhecida nas bases de dados de sequências nucleotídicas PDB, GENBANK, actualizações de GENBANK, EMBL e actualizações de EMBL.

Exemplo 2. Construção de um gene *sst* quimérico

O clone de ADNc de *sst* inteiro, designado pSST 103, foi utilizado para a introdução de um local *NcoI* no ATG (posição 34), e um local *EcoRV* a jusante do codão stop (na posição 1924) utilizando PCR. Do plasmídeo pMOG18 (Pen *et al.*, 1992) que contém o promotor CaMV35S estimulado, a sequência líder ALMV, o gene *uidA* e a sequência terminadora *nos*, a sequência de codificação de *uidA* foi substituída pelo ADNc de *sst*. pMOG18 foi digerido com *BamHI*, preenchido com ADN-polimerase Klenow, e digerido com *NcoI*. O fragmento de PCR de *sst*, cortado com *NcoI* e *EcoRI*, foi ligado neste vector, resultando no clone pSST217. O fragmento *EcoRI/HindIII* de pSST217 contendo a construção quimérica completa (enh.35S+ALMV-*sst*-*nos*) foi clonado no local *EcoRI* e *HindIII* de pBINPLUS (Van Engelen *et al.*, 1995), um vector binário de transformação de plantas derivado de pBIN19 (Bevan, 1984) resultando no plasmídeo pVS1 (Fig. 5A).

Exemplo 3. Construção de um gene *fft* quimérico

O clone de ADNc de *fft* inteiro, designado pFFT 111, foi utilizado para a introdução de um local *NcoI* no ATG (posição 29) e um local *BamHI* a jusante do codão stop (na posição 1874) utilizando PCR. Do plasmídeo pMOG18 (Pen *et al.*, 1992) que contém o promotor CaMV35S estimulado, a sequência líder ALMV, o gene *uidA* e a sequência terminadora *nos*, a sequência de codificação de *uidA* foi substituída pelo ADNc de *fft*. O fragmento de PCR digerido com *NcoI* e

*Bam*HI foi ligado no vector pMOG18 digerido com *Nco*I e *Bam*HI, resultando no clone pFFT209. O fragmento *Hind*III/*Eco*RI de pFFT209 contendo a construção quimérica completa (enh.35S+ALMV-*fft-nos*) foi clonado no local *Hind*III e *Eco*RI de pBINPLUS (Van Engelen et al., 1995), um vector binário de transformação de plantas derivado de pBIN19 (Bevan, 1984) resultando no plasmídeo pVF1 (Fig. 5B).

Exemplo 4. Transformação de plantas de Petúnia e batata

Os vectores binários pVS1 e pVF1 (Fig. 5) foram conjugados a partir de *E. coli* XL1-Blue com a estirpe AGLO de *Agrobacterium tumefaciens* através de cruzamento triparental (Ditta et al., 1980). Os exconjugados foram utilizados para transformar discos foliares de *Petunia hybrida* tal como descrito por Horsch et al., 1985. Os discos foliares foram preparados a partir de folhas do topo de plantas jovens que não floriam. A variedade W115 de *P. hybrida* foi utilizada para as experiências de transformação. Os exconjugados foram também utilizados para transformar explantes do caule de batateiros diplóides (*Solanum tuberosum*, variedade Kardal) tal como descrito anteriormente (Visser, 1991). Após regeneração de rebentos e raízes em meio contendo canamicina, as plantas foram colocadas em solo e transferidas para a estufa. Plantas regeneradas (em meio sem canamicina) a partir de discos foliares e de explantes do caule tratados com a estirpe AGLO de *Agrobacterium* sem um vector binário serviram como controlo.

Exemplo 5. Análise de plantas transgênicas expressando os genes *sst* e *fft*

Foram geradas cerca de 25 plantas transgênicas de *Petunia* e 25 batateiros transgênicos ancorando a construção pVS1 e 25 *Petunia* e batateiros transgênicos ancorando a construção pVF1. Dez *Petunia* e dez batateiros foram transformados com a estirpe AGL0 de *Agrobacterium* sem um vector binário. Estas plantas foram utilizadas como controlo. A análise de "Southern blot" do ADN genómico isolado a partir das plantas transformadas mostrou que em média eram integradas 1-5 cópias dos genes quiméricos introduzidos (dados não mostrados).

A composição em hidratos de carbono das plantas transgênicas foi analisada através de duas técnicas essencialmente diferentes: cromatografia de camada fina (TLC), que separa os hidratos de carbono com base na partição líquido-líquido (após TLC, os frutanos foram detectados através de uma reacção colorida específica da frutose) e HPAEC, que separa os hidratos de carbono em condições alcalinas (pH 13) com base na carga e detecta hidratos de carbono através de oxidação com um eléctrodo de ouro. A análise dos extractos de folhas do batateiro e de *Petunia* ancorando a construção pVS1 mostrou que ambas as espécies de plantas transgênicas contêm produtos que são o resultado da actividade de SST. A TLC mostrou a presença de pelo menos um trissacárido G-(F)₂ e de preferência também o

tetrassacárido G-(F)₃ e o pentassacárido G-(F)₄ em extractos de folhas de batateiro, enquanto que estes oligofrutanos estavam ausentes nas plantas de controlo (Fig. 6). A presença de G-(F)₂ e G-(F)₃ nos extractos de folhas de batateiro mas também de plantas de *P. hybrida* transgénicas foi demonstrada através de análise HPAE (Figs. 7 e 8). HPAEC, que é mais sensível e mais específica que TLC, revelou também uma pequena quantidade de G-(F)₄ em batateiros transgénicos (Fig. 8). Os resultados das Figs. 6-8 indicam claramente que o gene *sst* é expresso numa proteína SST enzimaticamente activa tanto em *P. hybrida* como em batateiro.

As plantas transgénicas ancorando a construção pVF1 não continham frutanos porque a FFT necessita de oligofrutanos (como G-(F)₂ ou G-(F)₃) como substratos iniciais para a síntese de frutanos. Os oligofrutanos não estão presentes em plantas sem actividade de SST tais como o batateiro ou a *Petunia* de tipo selvagem, ou plantas transgénicas contendo apenas a construção pVF1. A presença de actividade de FFT em plantas transgénicas ancorando a construção pVF1 é portanto verificada através de medições da actividade de FFT. O ensaio de FFT utilizado para avaliar a presença de uma FFT activa em batateiro transgénico foi baseado na capacidade da FFT para catalisar a síntese de G-(F)_n, n>4, à custa de G-(F)₄. O extracto proteico de folhas total de batateiro ancorando a construção pVF1, foi misturado com uma mistura de ensaio contendo G-(F)₄ e a presença de frutanos com um maior grau

de polimerização ($G-(F)_n$, $n > 4$) foi examinada através de TLC. Logo após 4 h de incubação, pôde-se detectar $G-(F)_5$ e $G-(F)_6$. Após 44 h de incubação, podiam ser detectados frutanos com um grau de polimerização superior a 4, incluindo $G-(F)_4$, $G-(F)_5$, $G-(F)_6$, $G-(F)_7$ e $G-(F)_8$, enquanto que estes frutanos estavam ausentes das misturas de controlo (Fig. 9). Isto indica que também o gene *fft* é expresso numa proteína FFT enzimaticamente activa.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Fig. 1. Análise das fracções de Mono Q da purificação de 1-SST e das fracções de Superdex HR 75 da purificação de 1-FFT em SDS-PAGE. Pista 1, marcador do Peso Molecular (PM é dado em kDa); pista 2, fracção de Mono Q com actividade de 1-SST; pista 3, fracções de Superdex HR 75 com actividade de 1-FFT.

Fig. 2. Separações em RP-HPLC de digeridos tripticos de: a. o polipéptido de 25 kDa de 1-SST (A); b. o polipéptido de 55 kDa de 1-SST (B); c. o polipéptido de 1-FFT de 70 kDa (C). As fracções de péptidos que eluem livres indicadas com setas foram colhidas manualmente e sujeitas a sequenciação de aminoácidos.

Fig. 3. Separações em HPAEC de oligofrutanos sintetizados a partir de sacarose através de 1-SST purificada (A) e através de uma mistura de 1-SST purificada e 1-FFT purificada (B). As reacções foram efectuadas em

sacarose 100 mol m^{-3} , DTT 2 mol m^{-3} , tampão citrato/fosfato 10 mol m^{-3} , pH 5,0, Na-azida a 0,01% a 25°C . O tempo da reacção foi de 80 h. A reacção foi parada fervendo a mistura reaccional durante 5 min. A ramnose foi utilizada como padrão interno.

Fig. 4. Sequência nucleotídica e sequência de aminoácidos deduzida do ADNc isolado de 1-SST (A) e 1-FFT (B). A sequência de aminoácidos determinada através de sequenciação dos aminoácidos (ver também Tabela 1) das proteínas 1-SST e 1-FFT purificadas está sublinhada.

Fig. 5. Construções génicas pVS1 (A) e pVF1 (B). As construções quiméricas consistem no promotor CaMV35S estimulado com o estimulador da tradução ALMV (X), a sequência de codificação de *sst* (Y) ou *fft* (W), e o sinal de terminação *nos* (Z). Os locais de restrição que foram utilizados no procedimento de clonagem estão indicados.

Fig. 6. Análise de TLC dos frutanos em batateiros transgénicos ancorando a construção pSF1. As placas de TLC foram reveladas duas vezes em acetona aquosa a 90%. S = padrão de sacarose, G = padrão de glicose, F = padrão de frutose, H = mistura padrão de frutanos de tubérculos de *H. tuberosus*, N = padrão de Neosugar, K = G-(F)₂-padrão. Os N^{os} 1-6 representam batateiros individuais ancorando a construção pVS1. C é a planta de controlo ancorando a construção AGL0.

Fig. 7. Separações em HPAEC de hidratos de carbono extraídos a partir de folhas de *Petunia hybrida* ancorando a construção pVS1 (a), uma mistura padrão de frutanos extraída de tubérculos de *H. tuberosus* (b), e hidratos de carbono de folhas da Petúnia de controlo ancorando a construção AGL0 (c).

Fig. 8. Separações em HPAEC dos hidratos de carbono extraídos de folhas de batateiro (*Solanum tuberosum*) ancorando a construção pVS1 (a), uma mistura padrão de frutanos extraída de tubérculos de *H. tuberosus* (b) e hidratos de carbono de folhas do batateiro de controlo ancorando a construção AGL0 (c).

Fig. 9. Análise de TLC de frutanos sintetizados a partir de G-(F)₄ através de extractos proteicos de folhas de batateiros transgénicos ancorando a construção pVF1. As placas de TLC foram reveladas duas vezes em butan-1-ol, propan-2-ol e água (3:12:4, v/v). S = padrão de sacarose; N = padrão de Neosugar, H = mistura padrão de frutanos de tubérculos de *H. tuberosus*. Os N^{os} 1-8 representam diferentes batateiros individuais transgénicos ancorando a construção pVF1. C₁ e C₂ são as plantas de controlo ancorando a construção AGL0.

DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

A nomenclatura dos frutanos está de acordo com Lewis (1993).

Unidade frutossil: uma molécula de frutose ligada a outra molécula de açúcar (p. ex., glicose, frutose ou galactose). Abreviada como -F (p. ex., em G-F) ou -F- (p. ex., G-F-F). Para moléculas consistindo em mais de uma unidade frutossil (p. ex., G-F-F-F-F-F-F) é utilizada uma designação condensada $[G-(F)_6]$ ou GF_6 . $G-(F)_6$ consiste numa unidade glicosil e 6 unidades frutossil. $G-(F)_6$ consiste numa ligação frutossil-glicose e 5 ligações frutossil-frutose.

Oligofrutanos: Qualquer composto com uma, duas ou três ligações frutossil-frutose (pode estar presente uma glicose mas não é necessário). No presente pedido, o termo oligofrutanos foi utilizado para denominar os produtos de actividade de SST [$G-(F)_2$, $G-(F)_3$ e $G-(F)_4$]. Os oligofrutanos são mais vulgarmente denominados como frutanos de cadeia curta ou frutanos com um baixo grau de polimerização. No presente pedido os oligofrutanos incluem também compostos consistindo em 2, 3 ou 4 unidades frutossil, mas sem a unidade glicosil.

Frutanos: Qualquer composto no qual uma ou mais ligações frutossil-frutose constituem a maioria das ligações (uma glicose pode estar presente mas não é necessário). Frutano é utilizado como sujeito numerativo em que os materiais referidos são quimicamente distintos (p. ex., os frutanos $G-(F)_2$ e $G-(F)_{13}$). no presente pedido, os frutanos são definidos como produtos de actividade de FFT ($G-F_n$, $2 \leq n < 160$). A menos que indicado de outro modo, os frutanos

incluem também oligofrutanos. Para denominar um grupo restrito de frutanos é utilizada a denominação "G-F_n, n=". No presente pedido os frutanos incluem também compostos consistindo em mais de 1 unidade frutossil, mas sem a unidade glicosil.

Inulina: Frutano que tem maioritariamente a ligação β -2,1-frutossil-frutose (pode estar presente uma glicose, mas não é necessário). A utilização cumulativa vs. numerativa como substantivo é a mesma que para o frutano acima.

Levano: Frutano que tem maioritariamente a ligação β -2,1-frutossil-frutose (é permitida uma glicose, mas não é necessário). O levano é também utilizado para denominar os frutanos de origem bacteriana, embora os frutanos bacterianos não consistam sempre em ligações predominantemente β -2,6-frutossil-frutose. Por exemplo, os frutanos sintetizados através de levanossacarase de *Bacillus subtilis* têm predominantemente ligações β -2,1-frutossil-frutose (inulina). A utilização cumulativa vs. numerativa de levano como substantivo é a mesma que para frutano.

Levanossacarase: Enzimas de origem bacteriana que estão envolvidas na síntese de frutano.

Sacarose:sacarose-frutossiltransferase (SST):
Enzima derivada de plantas que catalisa o passo inicial da

síntese de frutanos (reacção 2). A enzima pode também estar envolvida na síntese de oligofrutanos $[G-(F)_n, 2 \leq n \leq 4]$ (reacção 3). No presente pedido, a designação SST pode incluir 1-SST, uma forma de SST envolvida na biossíntese de oligofrutanos que possuem maioritariamente a ligação β -2,1-frutosil-frutose; ou 6-SST, uma forma de SST envolvida na biossíntese de oligofrutanos que têm maioritariamente a ligação β -2,6-frutosil-frutose; ou 1-SST e 6-SST.

Frutano:frutano-frutosiltransferase (FFT): Enzima derivada de plantas envolvida na síntese de frutanos. Enzima capaz de catalisar a síntese de oligofrutanos e frutanos de um grau mais elevado de polimerização. A FFT de *H. tuberosus* tem actividade sobreponível com a de SST de *H. tuberosus* (reacção 3), mas não pode catalisar o passo inicial da síntese de frutanos (reacção 2). No presente pedido, a designação FFT pode incluir 1-FFT, uma forma de FFT envolvida na biossíntese dos oligofrutanos que tem maioritariamente a ligação β -2,1-frutosil-frutose; ou 6-FFT, uma forma de FFT envolvida na biossíntese de frutanos que tem maioritariamente a ligação β -2,6-frutosil-frutose; ou 1-FFT e 6-FFT.

Invertase: β -frutosidase ou β -frutofuranosidase.

Grau de polimerização (GP): termo para indicar a quantidade total de resíduos frutosil e glicosil; por exemplo, $G-(F)_2$ tem um GP de 3. O valor de n em $G-F_n$ aumenta com um grau crescente de polimerização.

Perfil de frutanos: termo para descrever o padrão do tamanho/distribuição dos frutanos ou, alternativamente, as quantidades relativas e os tipos de frutanos, num extracto derivado por exemplo de uma planta, de um órgão vegetal ou de uma célula vegetal. O método actualmente de maior confiança para analisar um padrão de frutanos de um extracto é através da cromatografia de permuta aniónica de alta resolução e a detecção amperométrica pulsada (Chatterton et al., 1990).

Helianthus tuberosus: girassol-batateiro.

Cichorium intybus: chicória.

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Resolução. Técnica para a separação de misturas complexas de compostos. As variantes desta técnica são a cromatografia de alta resolução de fase reversa (**RP-HPLC**) ou a cromatografia de permuta aniónica de alta resolução em combinação com a detecção amperométrica pulsada (**HPAEC-PAD**, ver por exemplo Fig. 3).

REFERÊNCIAS

Angenent, G.C., Ebskamp, M.J.M., Weisbeek, P.J. e Smeekens, S.C.M., "Purification and properties of sucrose-sucrose fructosyltransferases in barley leaves and onion seeds", Em: Fuchs, A, ed. "Inulin and inulin containing crops", Elsevier, Amesterdão, Holanda, págs. 173-184, 1993.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. e Struhl, K., "Current protocols in molecular biology", John Wiley & Sons, 1994.

Bevan M., "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation", *Nucleic Acids Research* 12: 8711-8721, 1984.

Carlsson, J., "A levansucrase from *Streptococcus mutans*", *Caries Research* 4: 97-113, 1970.

Chatterton, N.J., Harrison, P.A., Thornley, W.R., Draper, E.A., "Oligosaccharids in foliage of *Agropyron*, *Bromus*, *Dactylis*, *Festuca*, *Lolium*, and *Phleum*", *New Phytologist* 114: 167-171, 1990.

Darwen, C.W.E., John, P., "Localization of the enzymes of fructan metabolism in vacuoles isolated by a mechanical method from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.)", *Plant Physiology* 89: 658-663, 1989.

Dedonder, R., "Levanosucrase from *Bacillus subtilus*", *Methods in Enzymology* 8: 500-505, 1966.

Ditta, G., Stanfield, S., Corbi, D. e Helinski, D.R., "Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium*

meliloti", *Proceedings National Academy Science USA* 77: 7347-7351, 1980.

Ebskamp, M.J.M., Van der Meer, I.M., Spronk, B.A., Weisbeek P.J. e Smeekens J.C.M., "Accumulation of fructose polymers in transgenic tabacco", *Bio/Technology* 12: 272-275, 1994.

Heinze, B. e Praznik, W., "Separation and purification of inulin oligomers and polymers by reversed-phase high-performance liquid chromatography", *Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium* 48: 207-225, 1991.

Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G. e Fraley, R.T., "A simple and general method for transferring genes into plants", *Science* 227: 1229-1232, 1985.

Jacques, N.A. "The fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius*", *New Phytologist* 123: 429-435, 1993.

Koops, A.J. e Jonker, H.H., "Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* "Colombia" I. Fructan:Fructan fructosyltransferase", *Journal of Experimental Botany* 45: 1623-1631, 1994.

Laemmli, U.K., "Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature* 227: 680-685, 1970.

Lewis, D.H., "Nomenclature and diagrammatic representation of oligomeric fructans - a paper for discussion", *New Phytologist* 124: 583-594, 1993.

Lüscher, M., Frehner, M., Nösberger, J., "Purification and characterization of fructan:fructan fructosyltransferase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.)", *New Phytologist* 123: 717-24, 1993.

Meier, H., Reid, J.S.G., "Reserve polysaccharides other than starch in higher plants", Em: Loewus, F.A., Tanner, W., eds. "Encyclopedia of Plant Physiology", New Series 13, Berlin, Springer Verlag, 1418-71, 1982.

Pen, J., Molendijk, L., Quax, W.J., Sijmons, P.C., van Ooyen, A.J.J., van den Elzen, P.J.M., Rietveld, K. e Hoekema, A. "Production of active *Bacillus licheniformis* alpha-amylase in tobacco and its application in starch liquefaction", *Bio/Technology* 10: 292-296, 1992.

Praznik, W., Beck, R.H.F. e Spies, Th., "Isolation and characterization of sucrose:sucrose 1F- β -D-fructosyltransferase from tubers of *Helianthus tuberosus*, L. *Agric. Biol. Chem.* 54: 2429-2431, 1990.

Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J.C., Ferrara, P. "In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis", *Analytical Biochemistry* 203: 173-179, 1992.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. "Molecular cloning. A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.

Sato, S., Kuramitsu, H.K., "Isolation and characterization of a fructosyltransferase gene from *Streptococcus mutans* GS-5", *Infect. Immun.* 52: 166-170, 1986.

Shiomi, N. e Izawa, M., "Purification and characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.)", *Agric. Biol. Chem.* 44: 603-614, 1980.

Steinmetz, M., Le Coq, D., Aymerich, S., Gonzy Treboul, G., Gay, P., "The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites", *Molecular & General Genetics* 200: 220-228, 1985.

Van der Meer, I.M., Ebskamp, M.J.M., Visser, R.G.F., Weisbeek, P.J. e Smeekens, J.C.M., "Fructan as a new carbohydrate sink in transgenic potato plants", *Plant Cell* 6: 561-570, 1994.

Van Engelen, F.A., Molthoff, J.W., Conner, A.J., Nap, J-P, Pereira, A. e Stiekema, W.J. "pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19", *Transgenic Research* 4: 288-290, 1995.

Visser, R.G.F., "Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*", Em: "Plant Tissue Culture Manual B5", editado por Lindsey, K., Dordrecht, Holanda, Kluwer Academic Publishers, págs. 1-9., 1991.

Wagner, W., Keller, F., Wiemken, "Fructan metabolism in cereals: induction in leaves and compartmentation in protoplasts and vacuoles", *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 112: 359-372, 1983.

Wise, C.S., Dimler, R.J., Davis, H.A., Rist, C.E., "Determination of easily hydrolysable fructose units in dextran preparations", *Analytical Chemistry* 27: 33-6, 1955.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE:

(A) NOME: Dr. Andries Jurriaan Koops

(B) RUA: Droevendaalsesteeg 1

(C) CIDADE: Wageningen

(E) PAÍS: The Netherlands
(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 6708 PB
(G) TELEFONE: 0317 477055
(H) TELECÓPIA: 0317 418094

(A) NOME: Dr. Ingrid Maria van der Meer
(B) RUA: Droevendaalsesteeg 1
(C) CIDADE: Wageningen
(E) PAÍS: The Netherlands
(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 6708 PB
(G) TELEFONE: 0317 477142
(H) TELECÓPIA: 0317 418094

(A) NOME: Dr. Arjen Johannes van Tunen
(B) RUA: Droevendaalsesteeg 1
(C) CIDADE: Wageningen
(E) PAÍS: The Netherlands
(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 6708 PB
(G) TELEFONE: 0317 477058
(H) TELECÓPIA: 0317 418094

(ii) TÍTULO DO INVENTO: Sequências de ADN codificando enzimas que sintetizam polímeros de hidratos de carbono e método para a produção de plantas transgênicas

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 16

(iv) FORMATO LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

(A) TIPO DE MEIO: Disquete

- (B) COMPUTADOR: Compatível com IBM PC
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SUPORTE LÓGICO: Patent In Release #1.0,
Versão #1.30 (EPO)

(v) DADOS ACTUAIS DO PEDIDO:

- (A) NÚMERO DO PEDIDO: PCT/NL96/00012

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 2116 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) FONTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Helianthus tuberosus*
- (B) ESTIRPE: Columbia
- (D) ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO: Adulto
- (F) TIPO DE TECIDO: Tubérculo
- (G) TIPO CELULAR: parênquima de armazenamento

(vii) FONTE IMEDIATA:

(A) BIBLIOTECA: lambda Uni-Zap XR (Stratagene, USA)

(B) CLONE: pSST103

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) LOCALIZAÇÃO: 34..1923

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 89/12386 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 21-JUN-1989

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 28-DEZ-1989

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 1: DE 1 A 4100

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/04692 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 09-AGO-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 03-MAR-1994

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 1: DE 1 A 1438

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/14970 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 28-DEZ-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 07-JUL-1994

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 1:

GGCACCAGAGAA AAAACCOCTCC CTCAGGCCAC CAC ATG ATG GCT TCA TCC ACC ACC	54
Met Met Ala Ser Ser Thr Thr	
1 5	
ACC ACC CCT CTC ATT CTC CAT GAT GAC CCT GAA AAC CTC CCA GAA CTC	102
Thr Thr Pro Leu Ile Leu His Asp Asp Pro Glu Asn Leu Pro Glu Leu	
10 15 20	
ACC GGT TCT CCG ACA ACT CGT CGT CTA TCC ATC GCA AAA GTG CTT TCG	150
Thr Gly Ser Pro Thr Thr Arg Arg Leu Ser Ile Ala Lys Val Leu Ser	
25 30 35	
GGG ATC CTT GTT TCG GTT CTG GTT ATA GGT GCT CTT GTT GCT TTA ATC	198
Gly Ile Leu Val Ser Val Leu Val Ile Gly Ala Leu Val Ala Leu Ile	
40 45 50 55	
AAC AAC CAA ACA TAT GAA TCC CCC TCG GCC ACC ACA TTC GTA ACT CAG	246
Asn Asn Gln Thr Tyr Glu Ser Pro Ser Ala Thr Thr Phe Val Thr Gln	
60 65 70	
TTG CCA AAT ATT GAT CTG AAG CGG GTT CCA GGA AAG TTG GAT TCG AGT	294
Leu Pro Asn Ile Asp Leu Lys Arg Val Pro Gly Lys Leu Asp Ser Ser	
75 80 85	
GCT GAG GTT GAA TGG CAA CGA TCC ACT TAT CAT TTT CAA CCC GAC AAA	342
Ala Glu Val Glu Trp Gln Arg Ser Thr Tyr His Phe Gln Pro Asp Lys	
90 95 100	
AAT TTC ATT AGC GAT CCT GAT GGC CCA ATG TAT CAC ATG GGA TGG TAT	390
Asn Phe Ile Ser Asp Pro Asp Gly Pro Met Tyr His Met Gly Trp Tyr	
105 110 115	
CAT CTA TTT TAT CAG TAC AAC CCT CAA TCT GCC ATC TGG GGC AAC ATC	438
His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Gln Ser Ala Ile Trp Gly Asn Ile	
120 125 130 135	
ACA TGG GGC CAC TCG GTA TCG AAA GAC ATG ATC AAC TGG TTC CAT CTC	486
Thr Trp Gly His Ser Val Ser Lys Asp Met Ile Asn Trp Phe His Leu	
140 145 150	
CCT TTC GCC ATG GTT CCT GAC CAT TGG TAC GAC ATC GAA GGT GTC ATC	534
Pro Phe Ala Met Val Pro Asp His Trp Tyr Asp Ile Glu Gly Val Met	
155 160 165	
ACG GGT TCG GCT ACA GTC CTC CCT AAT GGT CAA ATC ATC ATG CTT TAC	582
Thr Gly Ser Ala Thr Val Leu Pro Asn Gly Gln Ile Ile Met Leu Tyr	
170 175 180	
TCG GGC AAC GCG TAT GAT CTC TCC CAA GTA CAA TGC TTG GCG TAC GCT	630
Ser Gly Asn Ala Tyr Asp Leu Ser Gln Val Gln Cys Leu Ala Tyr Ala	
185 190 195	
GTC AAC TCG TCG GAT CCA CTT CTT ATA GAG TGG AAA AAA TAT GAA GGT	678
Val Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Ile Gln Trp Lys Lys Tyr Glu Gly	
200 205 210 215	

AAC CCT GTC TTA CTC CCA CCA CCA GGA GTA GGC TAC AAG GAC TTT CGG Asn Pro Val Leu Leu Pro Pro Pro Gly Val Gly Tyr Lys Asp Phe Arg 220 225 230	726
GAC CCA TCC ACA TTG TGG TCG GGC CCT GAT GGT GAA TAT AGA ATG GTA Asp Pro Ser Thr Leu Trp Ser Gly Pro Asp Gly Glu Tyr Arg Met Val 235 240 245	774
ATG GGC TCC AAG CAC AAC GAG ACT ATT GGC TGT GCT TTC ATT TAC CAT Met Gly Ser Lys His Asn Glu Thr Ile Gly Cys Ala Leu Ile Tyr His 250 255 260	822
ACC ACT AAT TTT ACG CAT TTT GAA TTG AAA GAG GAG GCG CTT CAT GCA Thr Thr Asn Phe Thr His Phe Glu Leu Lys Glu Glu Val Leu His Ala 265 270 275	870
GTC CCA CAT ACT GGT ATG TGG GAA TGT GTT GAT CTT TAC CCG GTG TCC Val Pro His Thr Gly Met Trp Glu Cys Val Asp Leu Tyr Pro Val Ser 280 285 290 295	918
ACC GTA CAC ACA AAC GGG CTG GAC ATG GTG GAT AAC GGG CCA AAT GTT Thr Val His Thr Asn Gly Leu Asp Met Val Asp Asn Gly Pro Asn Val 300 305 310	966
AAG TAC GCG TTG AAA CAA AGT GGG GAT GAA GAT CGC CAT GAT TGG TAT Lys Tyr Val Leu Lys Gln Ser Gly Asp Glu Asp Arg His Asp Trp Tyr 315 320 325	1014
GCA ATT GGA AGT TAC GAT ATA GTG AAT GAT AAG TGG TAC CCA GAT GAC Ala Ile Gly Ser Tyr Asp Ile Val Asn Asp Lys Trp Tyr Pro Asp Asp 330 335 340	1062
CCG GAA AAT GAT GTG GGT ATC GGA TTA AGA TAT GAT TTT GGA AAA TTT Pro Glu Asn Asp Val Gly Ile Gly Leu Arg Tyr Asp Phe Gly Lys Phe 345 350 355	1110
TAT GCG TCC AAG ACG TTT TAT GAC CAA CAT AAG AAG AGG AGA GTC CTT Tyr Ala Ser Lys Thr Phe Tyr Asp Gln His Lys Lys Arg Arg Val Leu 360 365 370 375	1158
TGG GGC TAT GTT GGA GAA ACC GAT CCC CAA AAG TAT GAC CTT TCA AAG Trp Gly Tyr Val Gly Glu Thr Asp Pro Gln Lys Tyr Asp Leu Ser Lys 380 385 390	1206
GGA TGG GCT AAC ATT TTG AAT ATT CCA AGG ACC GTC GTT TTG GAC CTC Gly Trp Ala Asn Ile Leu Asn Ile Pro Arg Thr Val Val Leu Asp Leu 395 400 405	1254
GAA ACT AAA ACC AAT TTG ATT CAA TGG CCA ATC GAG GAA ACC GAA AAC Glu Thr Lys Thr Asn Leu Ile Gln Trp Pro Ile Glu Glu Thr Glu Asn 410 415 420	1302
CTT AGG TCG AAA AAG TAT GAT GAA TTT AAA GAC GTC GAG CTT CGA CCC Leu Arg Ser Lys Lys Tyr Asp Glu Phe Lys Asp Val Glu Leu Arg Pro 425 430 435	1350

GGG GCA CTC GTT CCC CTT GAG ATA GGC ACA GCC ACA CAG TTG GAT ATA Gly Ala Leu Val Pro Leu Glu Ile Gly Thr Ala Thr Gln Leu Asp Ile 440 445 450 455	1396
GTT GCG ACA TTC GAA ATC GAC CAA AAG AFG TTG GAA TCA ACG CTA GAG Val Ala Thr Phe Glu Ile Asp Gln Lys Met Leu Glu Ser Thr Leu Glu 460 465 470	1446
GCC GAT GTT CTA TTC AAT TGC ACG ACT AGT GAA GGC TCG GTT GCA ACG Ala Asp Val Leu Phe Asn Cys Thr Ser Glu Gly Ser Val Ala Arg 475 480 485	1494
AGT GTG TTG GGA CCG TTT GGT GTG GTG GTT CTA GCC GAT GCC CAG CGC Ser Val Leu Gly Pro Phe Gly Val Val Val Leu Ala Asp Ala Gln Arg 490 495 500	1542
TCC GAA CAA CTT CCF GTA TAC TTC TAT ATC GCA AAA GAT ATT GAT GGA Ser Glu Gln Leu Pro Val Tyr Phe Tyr Ile Ala Lys Asp Ile Asp Gly 505 510 515	1590
ACC TCA CGA ACT TAT TTT TGT GCC GAC GAA ACA AGA TCA TCC AAG GAT Thr Ser Arg Thr Tyr Phe Cys Ala Asp Glu Thr Arg Ser Ser Lys Asp 520 525 530	1638
GTA AGC CTA GCG AAA TGC CTG TAC CGA AGC AGT GTT CCT GTC CTC CCA Val Ser Val Gly Lys Trp Val Tyr Gly Ser Ser Val Pro Val Leu Pro 540 545 550	1686
GGC GAA AAG TAC AAT AFG AGG TTA TTG GTG GAT CAT TCG ATA GTA GAG Gly Glu Lys Tyr Asn Met Arg Leu Leu Val Asp His Ser Ile Val Glu 555 560 565	1734
GGA TTT GCA CAA AAC GGG AGA ACC GTG GTG ACA TCA AGA GTG TAT CCA Gly Phe Ala Gln Asn Gly Arg Thr Val Val Thr Ser Arg Val Tyr Pro 570 575 580	1782
ACA AAG GCG ATC TAC AAC GCT GCG AAG GFG TTT TTG TTC AAC AAC GCG Thr Lys Ala Ile Tyr Asn Ala Ala Lys Val Phe Leu Phe Asn Asn Ala 585 590 595	1830
ACT GCA ATC AGT GTG AAG GCG TCG ATC AAG ATC TCG AAG ATG GGG GAA Thr Gly Ile Ser Val Lys Ala Ser Ile Lys Ile Trp Lys Met Gly Glu 600 605 610 615	1878
GCA GAA CTC AAT CCT TTC CCT CTT CCT GCG TCG ACT TTC GAA CTT Ala Glu Leu Asn Pro Phe Pro Leu Pro Gly Trp Thr Phe Glu Leu 620 625 630	1926
TCATGGTAT ATTTTGGACC CTATATATGT GTTATTATCA TCATGGTAT ATTTTGGACC	1983
CTATATATGT GTTATTATCA TGAAGCATAA GTTTGCACTG CAGGGGGTAT TATTGTAATT	2043
TTATATGCAT GTTCTATTAC TTGTGAGGTT ATAGTATGTA ATTAATTAT TATATACTAT	2103
ATCAATTTCT AAT	2116

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 630 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 2:

Met Met Ala Ser Ser Thr Thr Thr Thr Pro Leu Ile Leu His Asp Asp
1 5 10 15
Pro Glu Asn Leu Pro Glu Leu Thr Gly Ser Pro Thr Thr Arg Arg Leu
20 25 30
Ser Ile Ala Lys Val Leu Ser Gly Ile Leu Val Ser Val Leu Val Ile
35 40 45
Gly Ala Leu Val Ala Leu Ile Asn Asn Gln Thr Tyr Glu Ser Pro Ser
50 55 60
Ala Thr Thr Phe Val Thr Gln Leu Pro Asn Ile Asp Leu Lys Arg Val
65 70 75 80
Pro Gly Lys Leu Asp Ser Ser Ala Glu Val Glu Trp Gln Arg Ser Thr
85 90 95
Tyr His Phe Gln Pro Asp Lys Asn Phe Ile Ser Asp Pro Asp Gly Pro
100 105 110
Met Tyr His Met Gly Trp Tyr His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Gln
115 120 125
Ser Ala Ile Trp Gly Asn Ile Thr Trp Gly His Ser Val Ser Lys Asp
130 135 140
Met Ile Asn Trp Phe His Leu Pro Phe Ala Met Val Pro Asp His Trp
145 150 155 160
Tyr Asp Ile Glu Gly Val Met Thr Gly Ser Ala Thr Val Leu Pro Asn
165 170 175
Gly Gln Ile Ile Met Leu Tyr Ser Gly Asn Ala Tyr Asp Leu Ser Gln
180 185 190
Val Gln Cys Leu Ala Tyr Ala Val Asn Ser Ser Asp Pro Leu Leu Ile
195 200 205
Glu Trp Lys Lys Tyr Glu Gly Asn Pro Val Leu Leu Pro Pro Pro Gly
210 215 220
Val Gly Tyr Lys Asp Phe Arg Asp Pro Ser Thr Leu Trp Ser Gly Pro
225 230 235 240
Asp Gly Glu Tyr Arg Met Val Met Gly Ser Lys His Asn Glu Thr Ile
245 250 255

Gly Cys Ala Leu Ile Tyr His Thr Thr Asn Phe Thr His Phe Glu Leu
 260 265 270
 Lys Glu Glu Val Leu His Ala Val Pro His Thr Gly Met Trp Glu Cys
 275 280 285
 Val Asp Leu Tyr Pro Val Ser Thr Val His Thr Asn Gly Leu Asp Met
 290 295 300
 Val Asp Asn Gly Pro Asn Val Lys Tyr Val Leu Lys Gln Ser Gly Asp
 305 310 315 320
 Glu Asp Arg His Asp Trp Tyr Ala Ile Gly Ser Tyr Asp Ile Val Asn
 325 330 335
 Asp Lys Trp Tyr Pro Asp Asp Pro Glu Asn Asp Val Gly Ile Gly Leu
 340 345 350
 Arg Tyr Asp Phe Gly Lys Phe Tyr Ala Ser Lys Thr Phe Tyr Asp Gln
 355 360 365
 His Lys Lys Arg Arg Val Leu Trp Gly Tyr Val Gly Glu Thr Asp Pro
 370 375 380
 Gln Lys Tyr Asp Leu Ser Lys Gly Trp Ala Asn Ile Leu Asn Ile Pro
 385 390 395 400
 Arg Thr Val Val Leu Asp Leu Glu Thr Lys Thr Asn Leu Ile Gln Trp
 405 410 415
 Pro Ile Glu Glu Thr Glu Asn Leu Arg Ser Lys Lys Tyr Asp Glu Phe
 420 425 430
 Lys Asp Val Glu Leu Arg Pro Gly Ala Leu Val Pro Leu Glu Ile Gly
 435 440 445
 Thr Ala Thr Gln Leu Asp Ile Val Ala Thr Phe Glu Ile Asp Gln Lys
 450 455 460
 Met Leu Glu Ser Thr Leu Glu Ala Asp Val Leu Phe Asn Cys Thr Thr
 465 470 475 480
 Ser Glu Gly Ser Val Ala Arg Ser Val Leu Gly Pro Phe Gly Val Val
 485 490 495
 Val Leu Ala Asp Ala Gln Arg Ser Glu Gln Leu Pro Val Tyr Phe Tyr
 500 505 510
 Ile Ala Lys Asp Ile Asp Gly Thr Ser Arg Thr Tyr Phe Cys Ala Asp
 515 520 525
 Glu Thr Arg Ser Ser Lys Asp Val Ser Val Gly Lys Trp Val Tyr Gly
 530 535 540
 Ser Ser Val Pro Val Leu Pro Gly Glu Lys Tyr Asn Met Arg Leu Leu
 545 550 555 560

Val Asp His Ser Ile Val Glu Gly Phe Ala Gln Asn Gly Arg Thr Val
 565 570 575
 Val Thr Ser Arg Val Tyr Pro Thr Lys Ala Ile Tyr Asn Ala Ala Lys
 580 585 590
 Val Phe Leu Phe Asn Asn Ala Thr Gly Ile Ser Val Lys Ala Ser Ile
 595 600 605
 Lys Ile Trp Lys Met Gly Glu Ala Glu Leu Asn Pro Phe Pro Leu Pro
 610 615 620
 Gly Trp Thr Phe Glu Leu
 625 630

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 2003 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) FONTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Helianthus tuberosus*
- (B) ESTIRPE: Columbia
- (D) ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO: Adulto
- (F) TIPO DE TECIDO: Tubérculo
- (G) TIPO CELULAR: parênquima de armazenamento

(vii) FONTE IMEDIATA:

- (A) BIBLIOTECA: lambda Uni-Zap XR (Stratagene,
USA)
- (B) CLONE: PFFT111

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCALIZAÇÃO: 29..1873

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

- (H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 89/12386 A1
- (I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 21-JUN-1989
- (J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 28-DEZ-1989
- (K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 3: DE 1 A
4100

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

- (H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/04692 A1
- (I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 09-AGO-1993
- (J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 03-MAR-1994
- (K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 3: DE 1 A
1438

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

- (H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/14970 A1
- (I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 28-DEZ-1993
- (J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 07-JUL-1994

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 3:

GGGACGAGTA CCACTCCAGT CAGTCACC ATG CAA ACC CCT GAA CCC TTT ACA Met Gln Thr Pro Glu Pro Phe Thr 635	52
GAC CTT GAA CAT GAA CCC CAC ACA CCC CTA CTG GAC CAC CAC CAC AAC Asp Leu Glu His Glu Pro His Thr Pro Leu Leu Asp His His His Asn 640 645 650	100
CCA CCA CCA CAA ACC ACC ACA AAA CCT TTG TTC ACC AGG GTF GTG TCC Pro Pro Pro Gln Thr Thr Thr Lys Pro Leu Phe Thr Arg Val Val Ser 655 660 665 670	148
GGT GTC ACC TTT GTT TTA TTC TTC TTT GGT TTC GCT ATC GTA TTC ATT Gly Val Thr Phe Val Leu Phe Phe Phe Gly Phe Ala Ile Val Phe Ile 675 680 685	196
GTT CTC AAC CAA CAG AAT TCT TCT GTT CGT ATC GTC ACC AAT TCG GAG Val Leu Asn Gln Gln Asn Ser Ser Val Arg Ile Val Thr Asn Ser Glu 690 695 700	244
AAA TCT TTT ATA AGG TAT TCG CAG ACC GAT CGC TTG TCG TGG GAA CGG Lys Ser Phe Ile Arg Tyr Ser Gln Thr Asp Arg Leu Ser Trp Glu Arg 705 710 715	292
ACC GCT TTT CAT TTT CAG CCT GCC AAG AAT TTT ATT TAC GAT CCA GAT Thr Ala Phe His Phe Gln Pro Ala Lys Asn Phe Ile Tyr Asp Pro Asp 720 725 730	340
GGT CAG TTG TTT CAC ATG GGC TGG TAC CAT ATG TTC TAT CAA TAC AAC Gly Gln Leu Phe His Met Gly Trp Tyr His Met Phe Tyr Gln Tyr Asn 735 740 745 750	388
CCA TAC GCA CCG GTT TGG GGC AAT ATG TCA TGG GGT CAC TCA GTG TCC Pro Tyr Ala Pro Val Trp Gly Asn Met Ser Trp Gly His Ser Val Ser 755 760 765	436
AAA GAC ATG ATC AAC TGG TAC GAG CTG CCA GTC GCT ATG GTC CCG ACC Lys Asp Met Ile Asn Trp Tyr Glu Leu Pro Val Ala Met Val Pro Thr 770 775 780	484
GAA TGG TAT GAT ATC GAG GGC GTC TTA TCC GGG TCT ACC ACC GTC CTT Glu Trp Tyr Asp Ile Glu Gly Val Leu Ser Gly Ser Thr Thr Val Leu 785 790 795	532
CCA AAC GGT CAG ATC TTT GCA TTG TAT ACT GGC AAC GCT AAT GAT TTT Pro Asn Gly Gln Ile Phe Ala Leu Tyr Thr Gly Asn Ala Asn Asp Phe 800 805 810	580
TCC CAA TTA CAA TGC AAA GCT GTA CCC GTA AAC TTA TCT GAC CCG CTT Ser Gln Leu Gln Cys Lys Ala Val Pro Val Asn Leu Ser Asp Pro Leu 815 820 825 830	628
CTT ATT GAG TGG GTC AAG TAT GAG GAT AAC CCA ATC CTG TAC ACT CCA Leu Ile Glu Trp Val Lys Tyr Glu Asp Asn Pro Ile Leu Tyr Thr Pro 835 840 845	676

CCA GGG ATT GGG TTA AAG GAC TAT CGG GAC CCG TCA ACA GTC TGG ACA Pro Gly Ile Gly Leu Lys Asp Tyr Arg Asp Pro Ser Thr Val Trp Thr 850 855 860	724
GGT CCC GAT GGA AAG CAT AGG ATG ATC ATG GGA ACT AAA CGT GGC AAT Gly Pro Asp Gly Lys His Arg Met Ile Met Gly Thr Lys Arg Gly Asn 865 870 875	772
ACA GGC ATG GTA CTT GTT TAC TAT ACC ACT GAT TAC ACG AAC TAC GAG Thr Gly Met Val Leu Val Tyr Tyr Thr Thr Asp Tyr Thr Asn Tyr Glu 880 885 890	820
TTG TTG GAT GAG CCG TTG CAC TCT GTT CCC AAC ACC GAT ATG TGG GAA Leu Leu Asp Glu Pro Leu His Ser Val Pro Asn Thr Asp Met Trp Glu 895 900 905 910	868
TGC GTC GAC TTT TAC CCG GTT TCG TTA ACC AAT GAT AGT GCA CTT GAT Cys Val Asp Phe Tyr Pro Val Ser Leu Thr Asn Asp Ser Ala Leu Asp 915 920 925	916
ATG GCG GCC TAT GGG TCG GGT ATC AAA CAC GTT ATT AAA GAA AGT TGG Met Ala Ala Tyr Gly Ser Gly Ile Lys His Val Ile Lys Glu Ser Trp 930 935 940	964
GAG GGA CAT GGA ATG GAT TGG TAT TCA ATC GGG ACA TAT GAC GCG ATA Glu Gly His Gly Met Asp Trp Tyr Ser Ile Gly Thr Tyr Asp Ala Ile 945 950 955	1012
AAT GAT AAA TGG ACT CCC GAT AAC CCG GAA CTA GAT GTC GGT ATC GGG Asn Asp Lys Trp Thr Pro Asp Asn Pro Glu Leu Asp Val Gly Ile Gly 960 965 970	1060
TTA CCG TGC GAT TAC GGG AGG TTT TTT GCA TCA AAG AGT CTT TAT GAC Leu Arg Cys Asp Tyr Gly Arg Phe Phe Ala Ser Lys Ser Leu Tyr Asp 975 980 985 990	1108
CCA TTG AAG AAA AGG AGG ATC ACT TGG GGT TAT GTT GGA GAA TCA GAT Pro Leu Lys Lys Arg Arg Ile Thr Trp Gly Tyr Val Gly Glu Ser Asp 995 1000 1005	1156
ACT GCT GAT CAG GAC CTC TCT AGA GGA TGG GCT ACT GTT TAT AAT GTT Ser Ala Asp Gln Asp Leu Ser Arg Gly Trp Ala Thr Val Tyr Asn Val 1010 1015 1020	1204
GGA AGA ACA ATT GTA CTA GAT AGA AAG ACC GGG ACC CAT TTA CTT CAT Gly Arg Thr Ile Val Leu Asp Arg Lys Thr Gly Thr His Leu Leu His 1025 1030 1035	1252
TGG CCC GTT GAG GAA GTC GAG AGT TTG AGA TAC AAC GGT CAG GAG TTT Trp Pro Val Glu Glu Val Glu Ser Leu Arg Tyr Asn Gly Gln Glu Phe 1040 1045 1050	1300
AAA GAG ATC AAG CTA GAG CCC GGT TCA ATC ATT CCA CTC GAC ATA GGC Lys Glu Ile Lys Leu Glu Pro Gly Ser Ile Ile Pro Leu Asp Ile Gly 1055 1060 1065 1070	1348

ACG GCT ACA CAG TTG GAC ATA GTT GCA ACA TTT GAG GTG GAT CAA GCA Thr Ala Thr Gln Leu Asp Ile Val Ala Thr Phe Glu Val Asp Gln Ala 1975 1080 1085	1396
GCG TTG AAC GCG ACA AGT GAA ACC GAT GAT ATT TAT GGT TGC ACC ACT Ala Leu Asn Ala Thr Ser Glu Thr Asp Asp Ile Tyr Gly Cys Thr Thr 1090 1095 1100	1444
ACC TTA SGT GCA GCC CAA AGG GGA AGT TTG GGA CCA TTT GGT CTT GCG Ser Leu Ala Ala Gln Arg Gly Ser Leu Gly Pro Phe Gly Leu Ala 1105 1110 1115	1492
GTT CTA GCC GAT GGA ACC CTT TCT GAG TTA ACT CCG GTT TAT TTC TAT Val Leu Ala Asp Gly Thr Leu Ser Glu Leu Thr Pro Val Tyr Phe Tyr 1120 1125 1130	1540
ATA GCT AAA AAG GCA GAT GGA GGT GTG TCG ACA CAT TTT TGT ACC GAT Ile Ala Lys Lys Ala Asp Gly Gly Val Ser Thr His Phe Cys Thr Asp 1135 1140 1145 1150	1588
AAG CTA AGG TCA TCA CTA GAT TAT GAT GGG GAG AGA GTG GTG TAT GGG Lys Leu Arg Ser Ser Leu Asp Tyr Asp Gly Glu Arg Val Val Tyr Gly 1155 1160 1165	1636
GCG ACT GTT CCT GTG TTA GAT GAT GAA GAA CTC ACA ATG AGG CTA TTG Gly Thr Val Pro Val Leu Asp Asp Glu Glu Leu Thr Met Arg Leu Leu 1170 1175 1180	1684
GTG GAT CAT TCG ATA GTG GAG GCG TTT CCG CAA GGA GGA AGG ACG GTT Val Asp His Ser Ile Val Glu Gly Phe Ala Gln Gly Gly Arg Thr Val 1185 1190 1195	1732
ATA ACA TCA AGG GCG TAT CCA ACA AAA GCG ATA TAC CAA CAA GCG AAG Ile Thr Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Lys Ala Ile Tyr Glu Gln Ala Lys 1200 1205 1210	1780
CTG TTC TTG TTC AAC AAC GCC ACA GGT ACG AGT GTG AAA GCA TCT CTC Leu Phe Leu Phe Asn Asn Ala Thr Gly Thr Ser Val Lys Ala Ser Leu 1215 1220 1225 1230	1828
AAG ATT TGG CAA ATG GCT TCT GCA CCA ATT CAT CAA TAC CCT TTT Lys Ile Trp Gln Met Ala Ser Ala Pro Ile His Gln Tyr Pro Phe 1235 1240 1245	1873
TAATTACCGG CTATCGCTAT CCTTTTGTGTT ATTGSTATTT ATGTATCTTA ATTTCTTTT	1933
AAACCTTTTT ATTTGATAAA TATTAGTTCT TGTTATTTGTG CTCTAGTAA TAAATGAATG	1993
GTGTTATGGG	2003

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 615 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 4:

```

Met Gln Thr Pro Glu Pro Phe Thr Asp Leu Glu His Glu Pro His Thr
 1           5           10           15
Pro Leu Leu Asp His His His Asn Pro Pro Pro Gln Thr Thr Thr Lys
           20           25           30
Pro Leu Phe Thr Arg Val Val Ser Gly Val Thr Phe Val Leu Phe Phe
           35           40           45
Phe Gly Phe Ala Ile Val Phe Ile Val Leu Asn Gln Gln Asn Ser Ser
           50           55           60
Val Arg Ile Val Thr Asn Ser Glu Lys Ser Phe Ile Arg Tyr Ser Gln
           65           70           75           80
Thr Asp Arg Leu Ser Trp Glu Arg Thr Ala Phe His Phe Gln Pro Ala
           85           90           95
Lys Asn Phe Ile Tyr Asp Pro Asp Gly Gln Leu Phe His Met Gly Trp
           100          105          110
Tyr His Met Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Tyr Ala Pro Val Trp Gly Asn
           115          120          125
Met Ser Trp Gly His Ser Val Ser Lys Asp Met Ile Asn Trp Tyr Glu
           130          135          140
Leu Pro Val Ala Met Val Pro Thr Glu Trp Tyr Asp Ile Glu Gly Val
           145          150          155          160
Leu Ser Gly Ser Thr Thr Val Leu Pro Asn Gly Gln Ile Phe Ala Leu
           165          170          175
Tyr Thr Gly Asn Ala Asn Asp Phe Ser Gln Leu Gln Cys Lys Ala Val
           180          185          190
Pro Val Asn Leu Ser Asp Pro Leu Leu Ile Glu Trp Val Lys Tyr Glu
           195          200          205
Asp Asn Pro Ile Leu Tyr Thr Pro Pro Gly Ile Gly Leu Lys Asp Tyr
           210          215          220
Arg Asp Pro Ser Thr Val Trp Thr Gly Pro Asp Gly Lys His Arg Met
           225          230          235          240
Ile Met Gly Thr Lys Arg Gly Asn Thr Gly Met Val Leu Val Tyr Tyr
           245          250          255

```

Thr Thr Asp Tyr Thr Asn Tyr Glu Leu Leu Asp Glu Pro Leu His Ser
 260 265 270
 Val Pro Asn Thr Asp Met Trp Glu Cys Val Asp Phe Tyr Pro Val Ser
 275 280 285
 Leu Thr Asn Asp Ser Ala Leu Asp Met Ala Ala Tyr Gly Ser Gly Ile
 290 295 300
 Lys His Val Ile Lys Glu Ser Trp Glu Gly His Gly Met Asp Trp Tyr
 305 310 315 320
 Ser Ile Gly Thr Tyr Asp Ala Ile Asn Asp Lys Trp Thr Pro Asp Asn
 325 330 335
 Pro Glu Leu Asp Val Gly Ile Gly Leu Arg Cys Asp Tyr Gly Arg Phe
 340 345 350
 Phe Ala Ser Lys Ser Leu Tyr Asp Pro Leu Lys Lys Arg Arg Ile Thr
 355 360 365
 Trp Gly Tyr Val Gly Glu Ser Asp Ser Ala Asp Gln Asp Leu Ser Arg
 370 375 380
 Gly Trp Ala Thr Val Tyr Asn Val Gly Arg Thr Ile Val Leu Asp Arg
 385 390 395 400
 Lys Thr Gly Thr His Leu Leu His Trp Pro Val Glu Glu Val Glu Ser
 405 410 415
 Leu Arg Tyr Asn Gly Gln Glu Phe Lys Glu Ile Lys Leu Glu Pro Gly
 420 425 430
 Ser Ile Ile Pro Leu Asp Ile Gly Thr Ala Thr Gln Leu Asp Ile Val
 435 440 445
 Ala Thr Phe Glu Val Asp Gln Ala Ala Leu Asn Ala Thr Ser Glu Thr
 450 455 460
 Asp Asp Ile Tyr Gly Cys Thr Thr Ser Leu Gly Ala Ala Gln Arg Gly
 465 470 475 480
 Ser Leu Gly Pro Phe Gly Leu Ala Val Leu Ala Asp Gly Thr Leu Ser
 485 490 495
 Glu Leu Thr Pro Val Tyr Phe Tyr Ile Ala Lys Lys Ala Asp Gly Gly
 500 505 510
 Val Ser Thr His Phe Cys Thr Asp Lys Leu Arg Ser Ser Leu Asp Tyr
 515 520 525
 Asp Gly Glu Arg Val Val Tyr Gly Gly Thr Val Pro Val Leu Asp Asp
 530 535 540
 Glu Glu Leu Thr Met Arg Leu Leu Val Asp His Ser Ile Val Glu Gly
 545 550 555 560

(A) BIBLIOTECA: lambda Uni-Zap XR (Stratagene, USA)

(B) CLONE: pSST103

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 89/12386 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 21-JUN-1989

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 28-DEZ-1989

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 5: DE 1 A 4100

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/04692 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 09-AGO-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 03-MAR-1994

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 5: DE 1 A 1438

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/14970 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 28-DEZ-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 07-JUL-1994

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 5:

GARCARYTNC CNGTNTAYTT YTAYATHGCN AAR

33

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) FONTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Helianthus tuberosus*
- (B) ESTIRPE: Columbia
- (D) ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO: Adulto
- (F) TIPO DE TECIDO: Tubérculo
- (G) TIPO CELULAR: parênquima de armazenamento

(vii) FONTE IMEDIATA:

- (A) BIBLIOTECA: lambda Uni-Zap XR (Stratagene, USA)
- (B) CLONE: pFFT111

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

- (H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 89/12386 A1
- (I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 21-JUN-1989
- (J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 28-DEZ-1989
- (K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 6: DE 1 A

4100

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/04692 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 09-AGO-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 03-MAR-1994

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 6: DE 1 A
1438

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/14970 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 28-DEZ-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 07-JUL-1994

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 6:

GGNTGGGCNA CNGTNTAYAA T

21

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIA: dupla

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) FONTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Helianthus tuberosus*

(B) ESTIRPE: Columbia

(D) ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO: Adulto

(F) TIPO DE TECIDO: Tubérculo

(G) TIPO CELULAR: parênquima de armazenamento

(vii) FONTE IMEDIATA:

(A) BIBLIOTECA: lambda Uni-Zap XR (Stratagene, USA)

(B) CLONE: pFFT111

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 89/12386 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 21-JUN-1989

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 28-DEZ-1989

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 7: DE 1 A 4100

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/04692 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 09-AGO-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 03-MAR-1994

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 7: DE 1 A 1438

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/14970 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 28-DEZ-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 07-JUL-1994

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 7:

ATHGTNGARG GNTTYGCNCA R

21

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADEIA: dupla

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) FONTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Helianthus tuberosus*

(B) ESTIRPE: Columbia

(D) ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO: Adulto

(F) TIPO DE TECIDO: Tubérculo

(G) TIPO CELULAR: parênquima de armazenamento

(vii) FONTE IMEDIATA:

(A) BIBLIOTECA: lambda Uni-Zap XR (Stratagene,
USA)

(B) CLONE: pFFT111

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 89/12386 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 21-JUN-1989

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 28-DEZ-1989

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 8: DE 1 A
4100

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/04692 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 09-AGO-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 03-MAR-1994

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 8: DE 1 A
1438

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/14970 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 28-DEZ-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 07-JUL-1994

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 8:

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 16 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADnc

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) FONTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Helianthus tuberosus*
- (B) ESTIRPE: Columbia
- (D) ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO: Adulto
- (F) TIPO DE TECIDO: Tubérculo
- (G) TIPO CELULAR: parênquima de armazenamento

(vii) FONTE IMEDIATA:

- (A) BIBLIOTECA: lambda Uni-Zap XR (Stratagene, USA)
- (B) CLONE: pSST103

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

- (H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 89/12386 A1
- (I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 21-JUN-1989

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) FONTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Helianthus tuberosus*

(B) ESTIRPE: Columbia

(D) ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO: Adulto

(F) TIPO DE TECIDO: Tubérculo

(G) TIPO CELULAR: parênquima de armazenamento

(vii) FONTE IMEDIATA:

(A) BIBLIOTECA: lambda Uni-Zap XR (Stratagene, USA)

(B) CLONE: pSST103

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 89/12386 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 21-JUN-1989

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 28-DEZ-1989

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 10: DE 1 A 4100

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/04692 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 09-AGO-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 03-MAR-1994

- (B) ESTIRPE: Columbia
- (D), ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO: Adulto
- (F) TIPO DE TECIDO: Tubérculo
- (G) TIPO CELULAR: parênquima de armazenamento

(vii) FONTE IMEDIATA:

- (A) BIBLIOTECA: lambda Uni-Zap XR (Stratagene, USA)
- (B) CLONE: pFFT111

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

- (H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 89/12386 A1
- (I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 21-JUN-1989
- (J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 28-DEZ-1989
- (K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 11: DE 1 A 4100

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

- (H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/04692 A1
- (I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 09-AGO-1993
- (J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 03-MAR-1994
- (K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 11: DE 1 A 1438

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

- (H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/14970 A1
- (I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 28-DEZ-1993
- (J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 07-JUL-1994

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 11:

Val Val Leu Asp Leu Glu Thr Lys
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 15 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNC

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) FONTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Helianthus tuberosus*
- (B) ESTIRPE: Columbia
- (D) ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO: Adulto
- (F) TIPO DE TECIDO: Tubérculo
- (G) TIPO CELULAR: parênquima de armazenamento

(vii) FONTE IMEDIATA:

- (A) BIBLIOTECA: lambda Uni-Zap XR (Stratagene, USA)

(B) CLONE: pSST103

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 89/12386 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 21-JUN-1989

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 28-DEZ-1989

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 12: DE 1 A
4100

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/04692 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 09-AGO-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 03-MAR-1994

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 12: DE 1 A
1438

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/14970 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 28-DEZ-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 07-JUL-1994

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 12:

Phe	Arg	Asp	Pro	Ser	Thr	Leu	Trp	Leu	Xaa	Pro	Asp	Gly	Glu	Tyr
1				5					10					15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 6 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) FONTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Helianthus tuberosus*
- (B) ESTIRPE: Columbia
- (D) ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO: Adulto
- (F) TIPO DE TECIDO: Tubérculo
- (G) TIPO CELULAR: parênquima de armazenamento

(vii) FONTE IMEDIATA:

- (A) BIBLIOTECA: lambda Uni-Zap XR (Stratagene, USA)
- (B) CLONE: pSST103

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

- (H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 89/12386 A1
- (I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 21-JUN-1989
- (J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 28-DEZ-1989
- (K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 13: DE 1 A 4100

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/04692 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 09-AGO-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 03-MAR-1994

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 13: DE 1 A
1438

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/14970 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 28-DEZ-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 07-JUL-1994

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 13:

Gly Trp Ala Asn Ile Leu
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADEIA: dupla

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADnc

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) FONTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Helianthus tuberosus*

(B) ESTIRPE: Columbia

(D) ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO: Adulto

(F) TIPO DE TECIDO: Tubérculo

(G) TIPO CELULAR: parênquima de armazenamento

(vii) FONTE IMEDIATA:

(A) BIBLIOTECA: lambda Uni-Zap XR (Stratagene, USA)

(B) CLONE: pFFT111

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 89/12386 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 21-JUN-1989

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 28-DEZ-1989

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 14: DE 1 A 4100

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/04692 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 09-AGO-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 03-MAR-1994

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 14: DE 1 A 1438

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/14970 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 28-DEZ-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 07-JUL-1994

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 14:

Gly Trp Ala Thr Val Tyr Asn Val Gly Arg
1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 16 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADEIA: dupla

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) FONTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Helianthus tuberosus*

(B) ESTIRPE: Columbia

(D) ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO: Adulto

(F) TIPO DE TECIDO: Tubérculo

(G) TIPO CELULAR: parênquima de armazenamento

(vii) FONTE IMEDIATA:

(A) BIBLIOTECA: lambda Uni-Zap XR (Stratagene, USA)

(B) CLONE: pFFT111

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 89/12386 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 21-JUN-1989

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 28-DEZ-1989

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 15: DE 1 A 4100

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/04692 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 09-AGO-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 03-MAR-1994

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 15: DE 1 A 1438

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/14970 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 28-DEZ-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 07-JUL-1994

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 15:

Leu Leu Val Asp His Ser Ile Val Glu Gly Phe Ala Gln Gly Gly Arg
1 § 10 15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 6 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNC

(iii) HIPOTÉTICA: NÃO

(iv) ANTI-SENTIDO: NÃO

(vi) FONTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Helianthus tuberosus*
- (B) ESTIRPE: Columbia
- (D) ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO: Adulto
- (F) TIPO DE TECIDO: Tubérculo
- (G) TIPO CELULAR: parênquima de armazenamento

(vii) FONTE IMEDIATA:

- (A) BIBLIOTECA: lambda Uni-Zap XR (Stratagene, USA)
- (B) CLONE: pFFT111

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 89/12386 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 21-JUN-1989

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 28-DEZ-1989

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 16: DE 1 A
4100

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/04692 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 09-AGO-1993

(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 03-MAR-1994

(K) RESÍDUOS RELEVANTES EM SEQ ID NO: 16: DE 1 A
1438

(x) INFORMAÇÃO DA PUBLICAÇÃO:

(H) NÚMERO DO DOCUMENTO: WO 94/14970 A1

(I) DATA DE APRESENTAÇÃO: 28-DEZ-1993

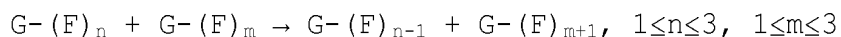
(J) DATA DE PUBLICAÇÃO: 07-JUL-1994

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 16:

Val Gly Glu Ser Asp Ser
1 5

REIVINDICAÇÕES

1. Fragmento de ADN possuindo uma sequência nucleotídica SEQ ID NO: 1 tal como mostrada na Fig. 4A ou uma sequência homóloga possuindo uma identidade de pelo menos 70% codificando uma proteína possuindo actividade de 1-sacarose:sacarose-frutosiltransferase, que catalisa a reacção geral:



em que -G representa uma unidade glicosil e -F representa uma unidade frutosil.

2. Fragmento de ADN de acordo com a reivindicação 1 possuindo uma identidade de pelo menos 85%.

3. Sequência de ADN recombinante compreendendo um ou mais fragmentos de ADN tal como definidos na reivindicação 1 ou 2.

4. Sequência de ADN recombinante de acordo com a reivindicação 3, compreendendo ainda um fragmento de ADN possuindo uma sequência nucleotídica SEQ ID NO: 2 tal como mostrada na Fig. 4B ou uma sequência homóloga possuindo uma identidade de pelo menos 70% codificando uma proteína possuindo actividade de 1-frutano:frutano-frutosiltransferase, que catalisa a reacção geral:

$$G-(F)_n + G-(F)_m \rightarrow G-(F)_{n-1} + G-(F)_{m+1}, \quad n \geq 2, \quad m \geq 2$$

em que -G e -F são tal como definidos na reivindicação 1.

5. Sequência de ADN recombinante de acordo com a reivindicação 3 ou 4, em que o referido fragmento ou fragmentos estão presentes na orientação inversa.

6. Método para a produção de uma planta geneticamente transformada apresentando um perfil de frutanos modificado, que compreende os passos de:

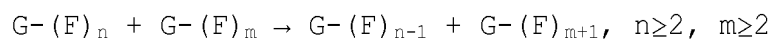
i) preparação de uma construção génica quimérica compreendendo um ou mais fragmentos de ADN tal como definidos nas reivindicações 1 ou 2, ou os referidos fragmentos na orientação inversa, operativamente ligados a uma sequência promotora activa na referida planta e uma sequência terminadora activa na referida planta,

ii) introdução da construção génica quimérica no genoma da planta, e

iii) regeneração das células vegetais transformadas em plantas transgênicas.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que a construção génica quimérica preparada no passo i) compreende ainda um fragmento de ADN possuindo uma sequência nucleotídica SEQ ID NO: 2 tal como mostrada na Fig. 4B ou uma sequência homóloga possuindo uma identidade de pelo menos 70% codificando uma proteína possuindo

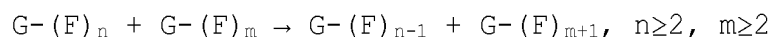
actividade de 1-frutano:frutano-frutosiltransferase, que catalisa a reacção geral:



em que -G e -F são tal como definidos na reivindicação 1.

8. Planta transformada mostrando uma perfil de frutanos modificado ou uma célula vegetal, semente, fruto, plântula ou qualquer parte da planta transformada, ancorando uma construção génica quimérica compreendendo um ou mais fragmentos de ADN tal como definidos nas reivindicações 1 ou 2, ou os referidos fragmentos de ADN na orientação inversa operativamente ligados a uma sequência promotora activa na referida planta e uma sequência terminadora activa na referida planta.

9. Planta transformada de acordo com a reivindicação 8 em que a construção génica quimérica compreende ainda um fragmento de ADN possuindo uma sequência nucleotídica SEQ ID NO: 2 tal como mostrada na Fig. 4B ou uma sequência homóloga possuindo uma identidade de pelo menos 70% codificando uma proteína possuindo actividade de 1-frutano:frutano-frutosiltransferase, que catalisa a reacção geral:



em que -G e -F são tal como definidos na reivindicação 1.

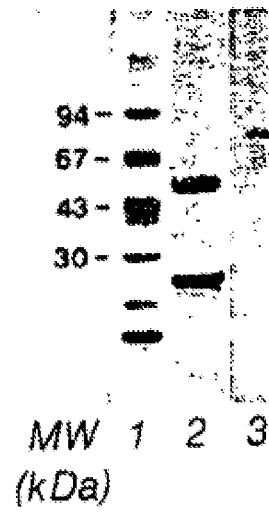


Fig. 1.

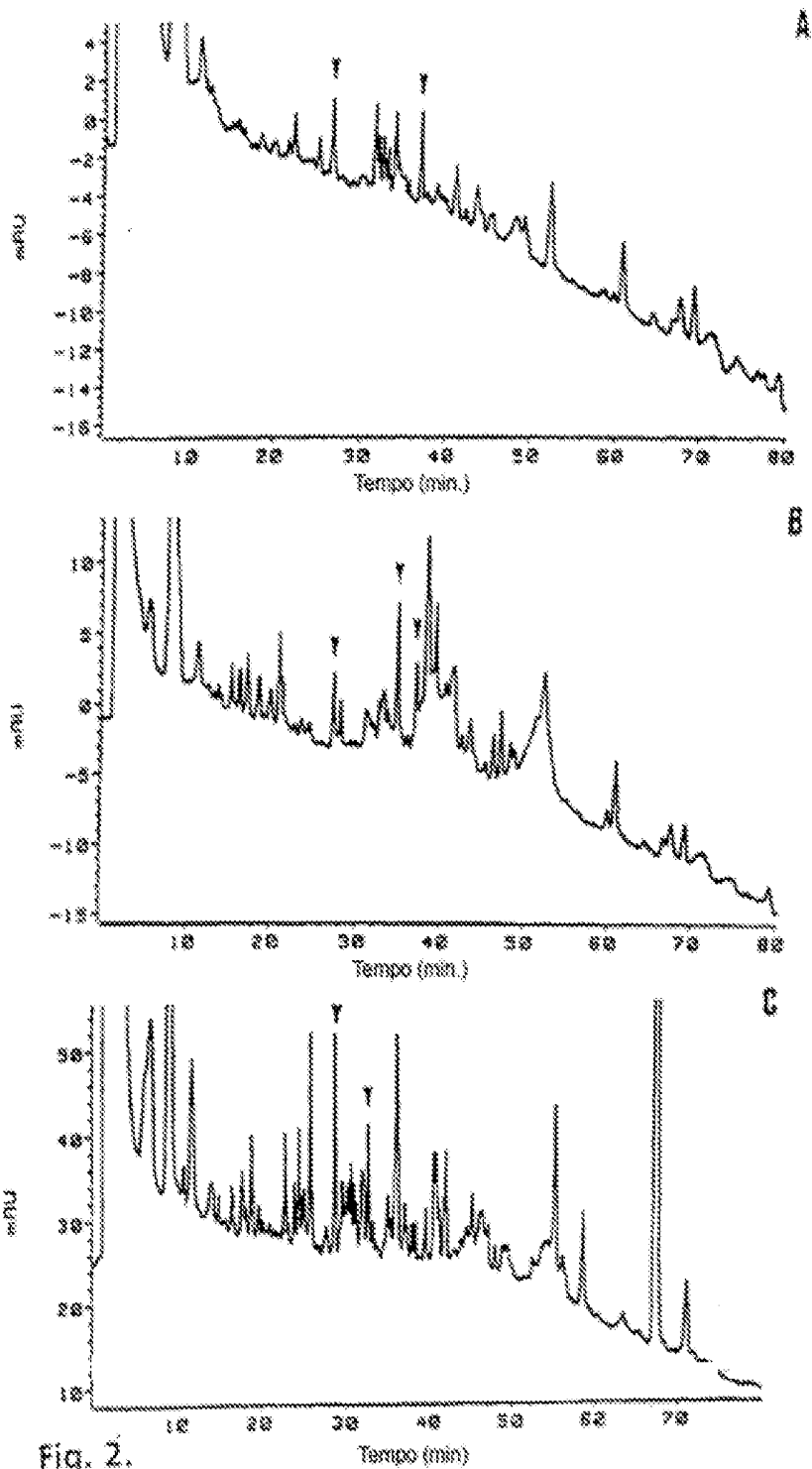


Fig. 2.

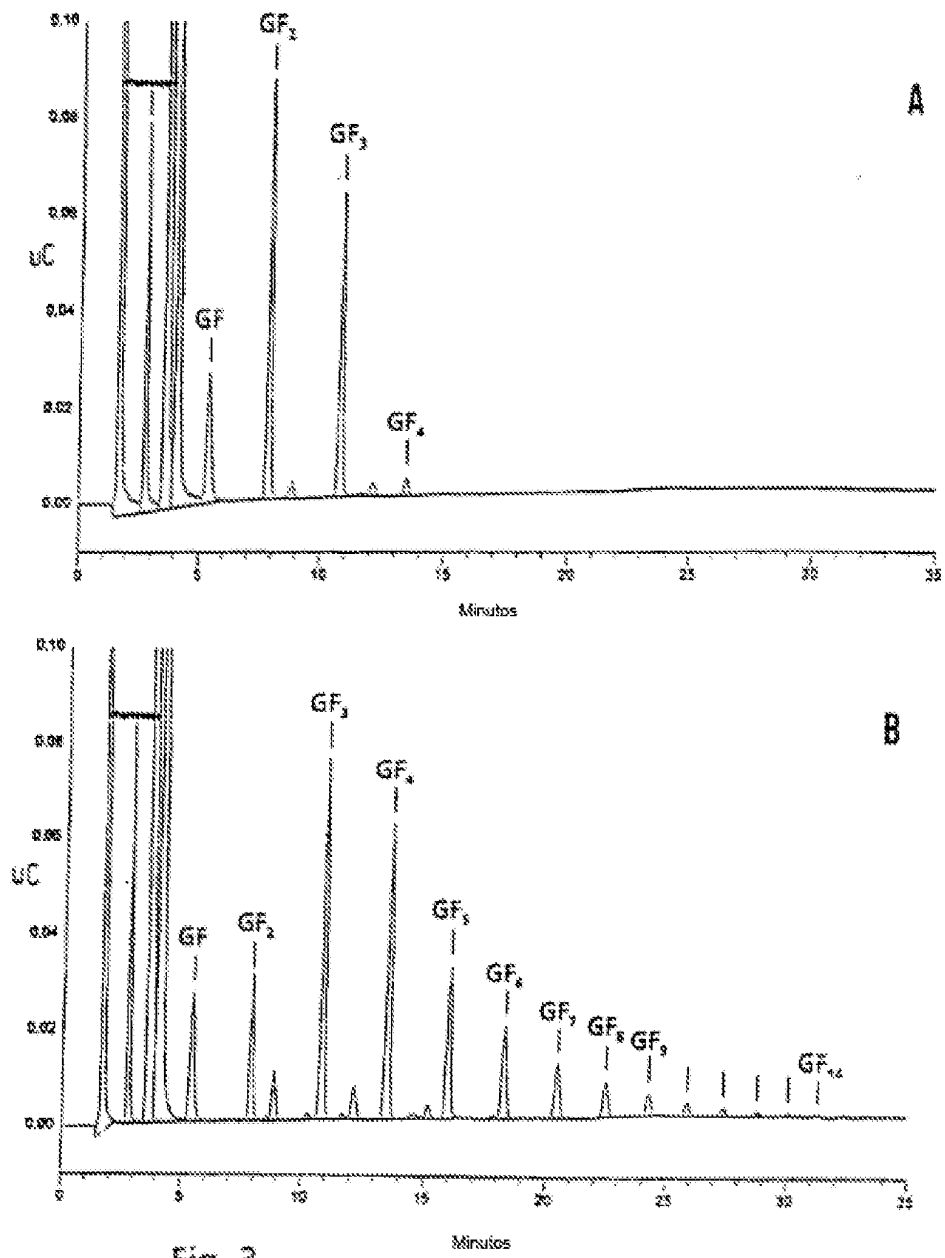


Fig. 3.

A. SEQ ID. NO. 1.

FIG. 4

GGCAGGAGAAAAACCCCTCCCTCAGGGCCACACATGATGGGTTCCATCCACCACCCACC 60
M M A S S T T T T
CCTCTCNTTCCTCATSATGACCTGAAAAACCTCCAGAACTCACCCGGTTCTCCGACAACT 120
P L I L N D D F E N L P E L T G S P T T
CGTCCCTCATCCATCGCAAAAGTGCTTTCCGGGATCCCTTGTTCGGTTCTGCTTATAGGT 180
R R L S I A K V L S G I L V S V L V I G
GCTCTTGTTCCTTAATCAACAACCCRAACATATGAAATCCCCCTCCGGCCACCACATTCGTA 240
A L V A L I N N Q T Y E S P S A T T F V
ACTCAGTTGCCAAATATTGATCTGAAAGCGGGTTCCAGGAAAGTTGGATTGGACTGCTGAC 300
T Q L P N I D L K R V P C K L D S S A E
GTTGAATGCCAACCATCCACTTATCATTTTCAACCCGACAAAAATTTTCATTAGCGATCCT 360
V E W Q R S T Y H F Q P D K N F I S D P
GATGGCCCAATGNTACATGGGATGGTATCATCTAATTTATCAGTACAAACCCCAATCT 420
D G P H Y R N G W Y K L F Y Q Y N P Q S
GCCATCTGGGGCAACATCAATGGGGCCACTCCGGTATCGAAAGACATGATCAACTGGCTC 480
A I W G N I T W C K S V S K D M I N W F
CATCTCCCTTTCGGCATGGTTCCCTGACCATGGTACGACATCGAAGCTGTCTATGACGGGT 540
H L P F A H V P D H W Y D I E G V X T G
TCGGCTACASTCCCTCCCTAATGGTCAATCATCATGCTTTACTCGGGCAACCCGATGAT 600
S A T V L P N G Q I I M L Y S G N A Y D
CTCTCCCAAGTACAATGCTTGGCGTACCGTGTCAACTCGTGGGATCCACTTCTTATAGAG 660
L S Q V Q C L A Y A V N S S D P L L I E
TGGAAAAAATATGAAAGGTAAACCTGTCTTACTCCCAACCACAGGAGTAGGCTACAAGGC 720
W X X Y E G N P V L L P P G V G Y X D
TTTCGGGACCCCTCCACATTTGCTGCTGGGGCCCTGATGGTGAATATGAAATGGTAAATGGGG 780
F R D F S T L W S G P D G E Y K M V M G
TCCAAGCACAACGAGACTATTGGCTGTGCTTTGATTTACCATCCACTAAITTTAGCCAT 840
S K H N E T I G C A L I Y H T T N F T H
TTTGAATGAAAGGGGGGGTGTTCCTGCACTCCCACTACTGCTATCTGGCAATGTCTT 900
P E L K E E V L H A V P H T G M W E C V
GATCTTACCCGGTGTCCACCGTACACACAAAACGGGGCTGGACATGGTGGATAACGGGCCA 960
D L Y P V S T V H T N G L D M V D N G P
AATGTTAAGTACCTGTTGAAACAAAAGTGGGGATGAAGATCCGCTGATTGGTATGCCAAT 1020
N V K Y V L K Q S G D E D R H D W Y A I
GGAAGTTACGATATATGAAATGTAAGTGGTACCCAGATGACCCGGAAATGATGTGGCT 1080
G S Y D I V N D K W Y P D D P E N D V G
ATCCGATTAAGATATGATTTTGGAAAATTTTATGCCCTCCAAAGACCTTTTATGACCAACAT 1140
I G L R Y D P G K F Y A S K T F Y D Q H
AAGTAGAGGAGACTCCCTTTGGGGCTATGTTGGAGAAACCSATCCCAAGATATGACCTT 1200
K K R R V L W G Y V G E T D P Q X Y D L
TLLAAGGGATGGCTAACATTTTGAATATTCGAAGGACCCCTCTTTTGGACCTCGAACT 1260
S K G W A K I L N I P R T V V L D L E T

FIG. 4

AAAACCAATTTGATTCAATGGCCAATCGAGGAAACCGAAAACCTTAGGTCGAAAAAGTAT 1320
K T N L I Q W P I E E T E N L R S X K Y
 GATGAATTTAAAGACGTCGAGCTTCGACCCGGGGCACTCGTTCCTTGGAGATAGGCACA 1380
 D E F K D V E L R P G A L V P L E I G T
 GCCACACAGTTGGATATAGTTGCGACATTCGAAATCGACCAAAAGATGTTGGAATCAACG 1460
 A T Q L D I V A T F E I D Q K M L E S T
 CTAGAGGCCGATGTTCTATTC AATTGCCACGACTAGTGAAGGCTCGGTTGCAAGGAGTGTG 1500
L P A D V L E N C T I S E G S V A R S V
 TTGGGACCGTTTGGTGTGGTGGTTCTAGCCGATGCCGCGCTCCGAAACAACTTCCCTGTA 1560
 L G P F G V V V L A D R Q R S E O L P V
 TACTTCTATATCGCAAAAGATATTGATGGAACTCAGCAACTTATTTTTGTGCCGACGAA 1620
Y F Y L A K D I D G T S R T Y F C A D E
 ACRAGATCATCCAAGGATGTAAGCGTAGCGAAATGGGGTGTSCGGAAGCAGTGTTCCTGTC 1680
 T R S S K D V S V G K W V Y G S S V P V
 CTCCCAGGCGAALAGTACAATATGAGCGTTATGGGTGGATCATTGATAGTAGAGGGGATT 1740
 L P G E K Y N M R L L V D H S I V E G F
 GCACAAAACGGGAGAACCCGTGCTGACATCAAGACTGTATCCAACAAGGGCGATCTACAAC 1800
 A Q N G R T V V T S R V Y P T X R I Y N
 GCTGCGAAGGTGTTTTTGTTCACCAACGGGACTGGAATCAGTGTGSAAGGCGTGGATCAAG 1860
 A A K V F L P N N A T G I S V K A S I R
 ATCTGGAGATGGGGGAGGCGAACTCAATCCTTTCCCTCTTCCCTGGGTGGACTTTTCAA 1920
 I W K M G E R E L N P F P L P G W T F E
 CTTTGATGGTTATATTTTGGACCCATATATGTTTATTATCATGACGTTATATTTTGG 1980
 L
 ACCCTATATATGTTTATTATCATGAAGCATAAGTTTGGACTGGAGGGGCTATTATTGTA 2040
 ATTTTATAGCATGTTCTATTACTTGTGGGTTATAGTATGTAATTAATTATTATATAC 2100
 TATATCAATTTCTAAT 2115

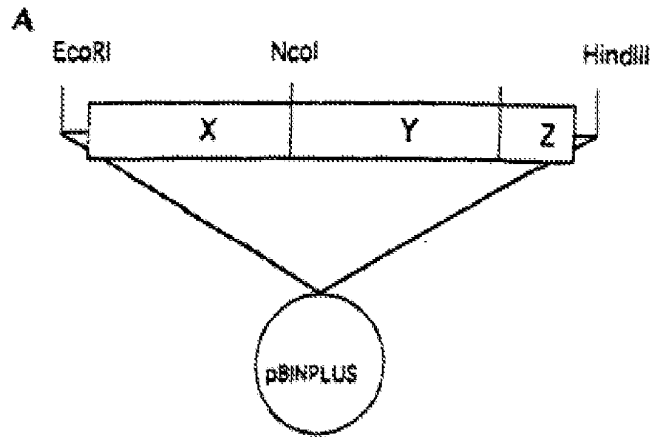
B. SEQ ID. NO. 2.

FIG. 4

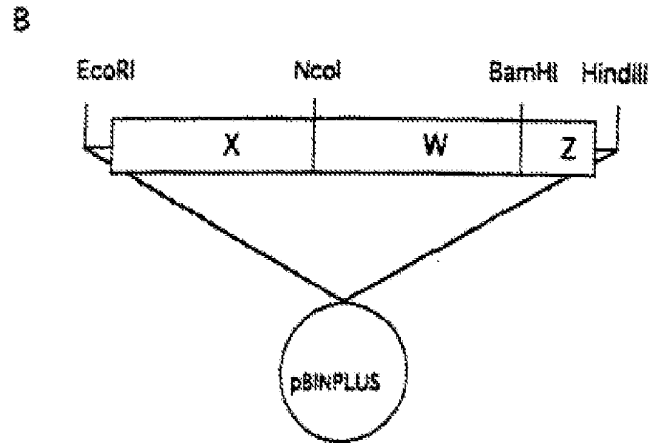
GGGACGAGTACCAGTCCAGTCAAGTCACCATGCAAAACCCCTGAACCCCTTACAGACCTTGA 60
M Q T F E P F T D L E
ACATGAACCCCCACACACCCCTACTGGACCACCACCACACACCCACCACCACCAAAACCACCAC 120
H E P H T P L L D H H H N P P P Q T T T
AAAACCTTTGTTCCACCAGGGTGTGTCCGGTSTCACCTTTGTTTATTCTTCTTTGGTTT 180
K P L F T R V V S G V T F V L F F F G F
CGCTATCGTATTCATTGTTTCTCAACCAACAGARTTCTTCTCTTCGTATCGTACCCAAATTC 240
A I V F I V L N Q Q N S S V R I V T N S
GGAGAAATCTTTTATAAGGTATTCCAGACCCGATCGCTTCTCTGTGGGAAACGGACCCGCTTT 300
E K S F I R Y S Q T D R L S W E R T A F
TCATTTTCAGCCCTGCCAAGAATTTTATTACGATCCAGATGGTCAAGTGTGTTTACATGGG 360
H F Q P A K N F I Y D P D G Q L F H M G
CTGGTACCATATGTTCTATCAATACAACCCATACCCACCCGTTTGGGGCAATATGTCAATG 420
W Y H H F Y Q Y N P Y A P V W G N M S W
GGGTCACTCAGTCTCCAAAGACATGATCAACTGGTACGAGCTCCAGTCCGCTATGGTCCC 480
G H S V S K D M I N W Y E L P V A M V P
CACCGAATGGTATGATATCGAGGSCCGTCTTATCCGGGTCTACCCCGCTCCCTCCAAAACGG 540
T E W Y D I E G V L S G S T T V L P N G
TCAGATCTTTGCATTGTATACTGGGAACCGCTAATGATTTTTCCCAATTACAAATGCAAAGC 600
Q I F A L Y T G N A N D F S Q L Q C K A
TGTACCCCGTAACCTTATCTGACCCCGCTTCTTATTGAGTGGGTCAAGTATGAGGATAACCC 660
V P V N L S D P L L I E W V K Y E D N P
AATCCTGTACACTCCACCAGGGATTGGGTTAABGGACTATCCGGACCCCTCAACAGTCTG 720
I L Y T P F G I G L K D Y R D P S T V W
GACAGGTCCCAGTGGAAAGCATAGGATGATCATGGGAACTAAACGTGGCAATACAGGCAT 780
T G P D G K H R M I M G T X R G N T G M
GGTACTTGTTTACTATAACCACTGATTACACGAACTACGAGTGTGTTGGNTGAGCCGTTGCA 840
V L V Y Y T T D Y T N Y E L L D E P L E
CTCTGTTCCCAACCCGATATGTGGGAAATGCGTGGACTTTTACCCCGTTTCGTTAACCAA 900
S V P N T D M W E C V D F Y P V S L T N
TGATAGTGCACCTTGATATGCGCGCCCTATGGGTGCGGATATCAAACACCGTATTAAAGAAAG 960
D S A L D M A A Y C S G I X H V I K E S
TTGGGAGGGACATGGAAATGGATTGGTATTCRAATCGGGACATATGACCGGATAAATGATAA 1020
W E G N G M D W Y S I G T Y D A I N D K
ATGGACTCCCGATAACCCGGAACTAGATGTCCGTATCGGOTTACCGTGCATTAACGGGGG 1080
W T P D N P E L D V C I G L R C D Y G R

FIG. 4

GTTTTTTCATCAAAGACTCTTTATGACCCATTGAAGAAAAGGAGGATCACTTGGGGTTA 1140
 F F A S K S L Y D P L K X R R I T W G Y
 TGTGGAGAATCAGATAGTGCCTGATCAGGACCTTCTCTAGAGGATGGGCTACTGTTATAA 1200
V G E S D S A D Q D L S R G W A T V Y N
 TGTGGAGAACAATTCTACTACATAGAAAAGACCCGGACCCATTACTTCATTGGCCCGT 1260
V G R T I V L D R K T G T H L L H W P V
 TGAGGAATCGAGAGTTTGAGATACAAACGGTCAGGAGTTTAAAGAGATCAAGCTACAGCC 1320
 E E V E S L R Y N G Q E F K E I K L E P
 CGGTTCAATCATTCCACTCGACATAGGCACGGCTACACAGTTGGACATAGTTGCAACATT 1380
 G S I I P L D I G T A T Q L D I V A T F
 TGAGGTGGATCAAGCAGCCGTTGAACCCGACAAGTGAALACCGATGATATTTATGGTTGGAC 1440
 E V D Q A A L N A T S E T D D I Y G C T
 CACTACCTTAGGTTGCAGCCCAAGGGGAAGTTTGGGACCATTGGTCTTGGCGTTCTAGC 1500
 T S L G A A Q R G S L G P F S L A V L A
 CGATGCAACCCCTTTGTGAGTTAACTCCGGTTTTATTTCTATATAGCTAAAAAGCCAGATGG 1560
 D G T L S E L T P V Y P Y I A K K A D G
 AGGTGTGTCCGACACATTTTTGTACCGATAAGCTAAGGTCATCACTAGATTATGATGGGGA 1620
 G V S T H F C T D K L R S S L D Y D G E
 GAGASTGGTGTATGGGGGCACTGGTTCCCTGTGTAGATGATGAAGAAGTCAACATGAGGCT 1680
 R V V Y G G T V P V L D D E E L T M R L
 ATTGGTGGATCATTTCGATAGTGGAGGGGTTTGGCCAAAGSAGGAAGGACCGTTATAACATC 1740
L V D H S I V E G F A Q G G R T V I T S
 AAGGCCGTATCCAAACAAAAGCGATATACGAACAAGCGAAGCTCTTCTTGTTCACCAACGC 1800
 R A Y P T K A I Y E Q A K L F L F N N A
 CAACGGTACGAGTGTGAAGCATCTCTCAAGATTTGGCAATGGCTTTCTCCACCAATTCA 1860
 T G T S V K A S L R I W Q M A S A P I H
 TCAATACCCCTTTTTAATTACCGGCTATCGCTATCCCTTTTTGTTATTGGTATTTATGTATC 1920
 Q Y P F
 TTAACTTTCTTTTAAACCTTTTTATTGGATAAATATTAGTTCTTGTATTGCTTCTIAG 1980
 TRATAAATGAATGGTCTTATGGG 2003



pVS1: enh.35S-AIMV-ssr-nos



pVF1: enh.35S-AIMV-fft-nos

Fig. 5

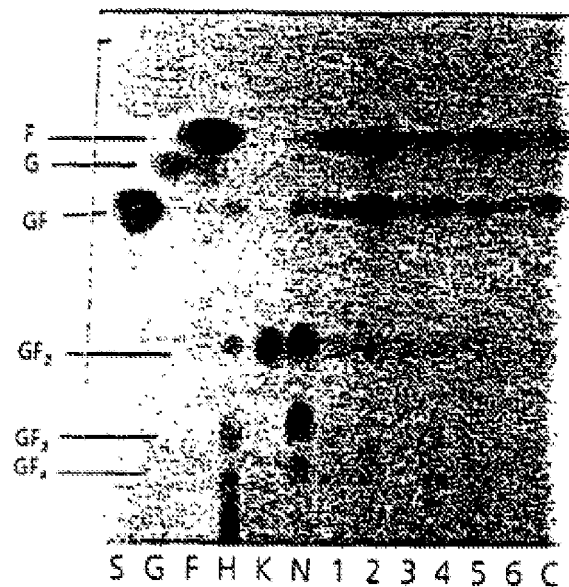
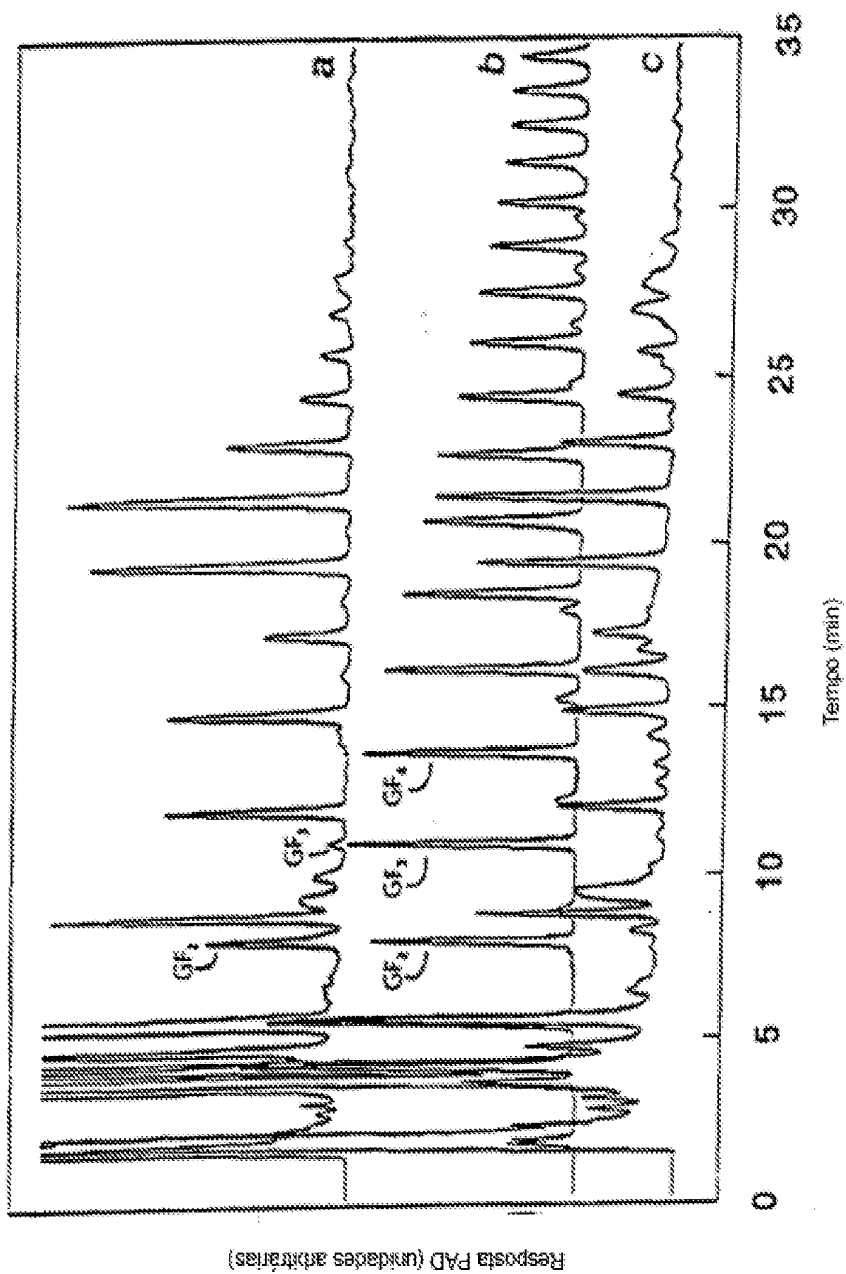
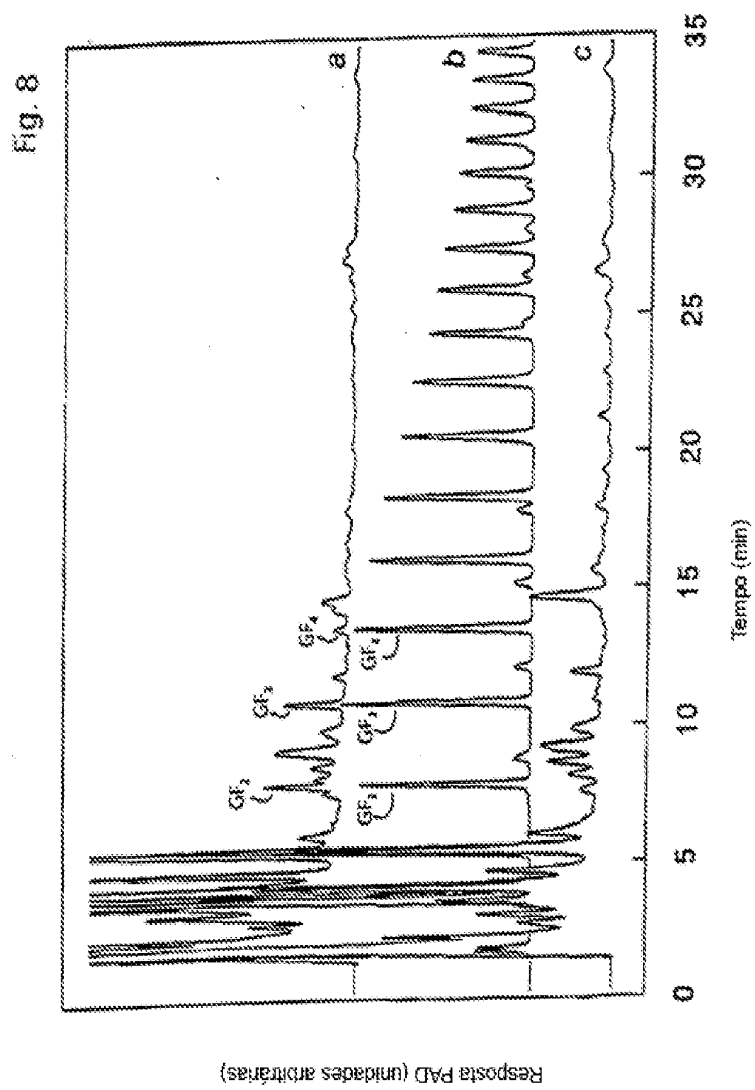


Fig. 6

Fig. 7





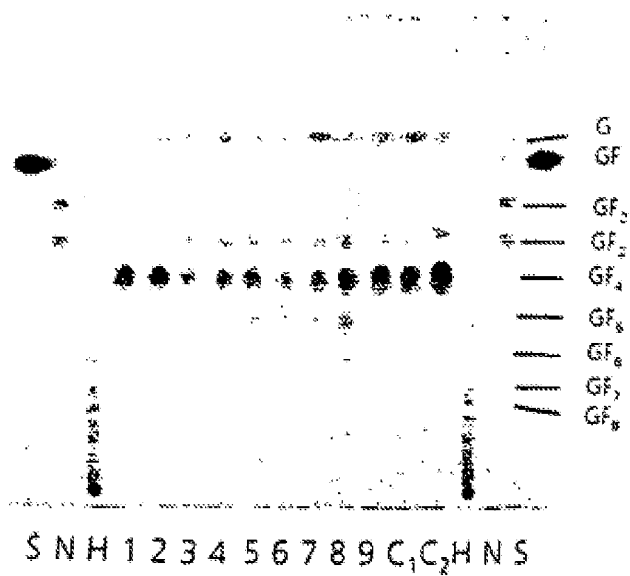


Fig. 9

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 8912386 A
- NL 9303646 A
- WO 9414970 A
- DE 4327051 A1
- WO 9404692 A
- WO 9117189 A
- WO 8912386 A1
- WO 9404692 A1
- WO 9414970 A1

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- Purification and properties of sucrose-sucrose fructosyltransferases in barley leaves and onion seeds. **ANGENENT GC ; EBSKAMP M.J.M ; WEISBEEK P.J ; SMEEKENS S.C.M.** Inulin and inulin containing crops. Elsevier, 1993, 173-184
- **AUSUBEL F.M ; BRENT R ; KINGSTON R.E ; MOORE D.D ; SEIDMAN J.G ; SMITH J.A ; STRUHL K.** Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, 1994
- **BEVAN M.** Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*, 1984, vol. 12, 6711-6721
- **CARLSSON J.** A levansucrase from *Streptococcus mutans*. *Carbohydrate Research*, 1970, vol. 4, 97-113
- **CHATTERTON N.J ; HARRISON P.A ; THORNLEY W.R ; DRAPER E.A.** Oligosaccharides in foliage of *Agropyron*, *Bromus*, *Dactylis*, *Festuca*, *Lolium*, and *Panicum*. *New Phytologist*, 1993, vol. 114, 167-171
- **DARWEN C.W.E ; JOHN P.** Localization of the enzymes of fructan metabolism in vacuoles isolated by a mechanical method from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L. *Plant Physiology*, 1969, vol. 89, 658-663
- **DEGONDER R.** Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology*, 1966, vol. 8, 500-505
- **DITTA G ; STANFIELD S ; CORBI D. ; HELINSKI D.R.** Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings National Academy Science*, 1980, vol. 77, 7347-7351
- **EBSKAMP M.J.M ; VAN DER MEER I.M ; SPRONK B.A ; WEISBEEK P.J ; SMEEKENS J.C.M.** Accumulation of fructose polymers in transgenic tobacco. *BioTechnology*, 1994, vol. 12, 272-275
- **HEINZE B ; PRAZNIK W.** Separation and purification of inulin oligomers and polymers by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium*, 1991, vol. 48, 207-225
- **HORSCH R.B ; FRY J.E ; HOFFMAN N.L ; EICH-HOLTZ D ; ROGERS S.G ; FRALEY R.T.** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 1985, vol. 227, 1239-1232
- **JACQUES N.A.** The fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius*. *New Phytologist*, 1993, vol. 123, 429-435
- **KOOPS A.J ; JONKER H.H.** Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* 'Colombia'. 1. Fructan:fructan fructosyltransferase. *Journal of Experimental Botany*, 1994, vol. 45, 1623-1631 [8076]
- **LAEMMLI U.K.** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, 680-685
- **LEWIS B.H.** Nomenclature and diagrammatic representation of oligomeric fructans - a paper for discussion. *New Phytologist*, 1993, vol. 124, 593-594
- **LÜSCHER M ; FREHNER M ; RÖSBERGER J.** Purification and characterization of fructan:fructan fructosyltransferase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L. *New Phytologist*, 1993, vol. 123, 717-724
- Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. **MEIER H ; REID J.S.G.** *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer Verlag, 1982, 1418-71

- PEN J; MOLENDIJK L; QUAX WJ; SIMONS PC; VAN GOYEN AJJ; VAN DEN ELZEN PJM; RIETVELD K.; HOEKEMA A. Production of active *Bacillus licheniformis* alpha-amylase in tobacco and its application in starch liquefaction. *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 292-298
- PRAZNIK W; BECK RHF; SPIES TH. Isolation and characterization of sucrose:sucrose 1F- β -D-fructosyltransferase from tubers of *Helianthus tuberosus* L. *Agric. Biol. Chem.*, 1990, vol. 54, 2428-2431 [0076]
- ROSENFELD J; CAPDEVIELLE J; GUILLEMOT JC; FERRARA P. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 1992, vol. 203, 173-179
- SAMBROOK J; FRITSCH EF; MANIATIS T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- SATO S; KURAMITSU HK. Isolation and characterization of a fructosyltransferase gene from *Streptococcus mutans* GS-5. *Infect. Immun.*, 1986, vol. 52, 166-170
- SHIOMI N; IZAWA M. Purification and characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Agric. Biol. Chem.*, 1980, vol. 44, 603-614
- STEINMETZ M; LE COQ D; AYMERICH S; GONZY TREBOUL G; GAY P. The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Molecular & General Genetics*, 1985, vol. 200, 220-226 [0076]
- VAN DER MEER JM; EBSKAMP MJM; VISSER RGF; WEISBEEK PJ; SMEEKENS JCM. Fructan as a new carbohydrate sink in transgenic potato plants. *Plant Cell*, 1994, vol. 6, 561-570
- VAN ENGELEN FA; MOLTHOFF JW; CONNER, AJ; NAP J-P; PEREIRA A; STIEKEMA WJ. pBIN-PLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19. *Transgenic Research*, 1995, vol. 4, 288-290
- Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. VISSER RGF. *Plant Tissue Culture Manual*. Kluwer Academic Publishers, 1991, 1-9
- WAGNER W; KELLER F; WREMKEN. Fructan metabolism in cereals: induction in leaves and compartmentation in protoplasts and vacuoles. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 1983, vol. 112, 359-372
- WISE CS; DIMLER RJ; DAVIS HA; RIST CE. Determination of easily hydrolysable fructose units in dextran preparations. *Analytical Chemistry*, 1955, vol. 27, 33-6