



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

(11) PI 0708477-3 B1

(22) Data do Depósito: 01/03/2007

(45) Data de Concessão: 11/07/2017



(54) Título: MÉTODO PARA IDENTIFICAR UMA PRIMEIRA PLANTA DE MILHO OU UM PRIMEIRO GERMOPLASMA DE MILHO COMPREENDENDO EM SEU GENOMA UM GENE DE DIAGLICEROL O-ACILTRANSFERASE DO TIPO 1 (DGAT), POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PLANTA OU PARTE DE PLANTA POSSUINDO UM FENÓTIPO SELECIONADO, MÉTODO PARA IDENTIFICAR A PRESENÇA DE UM LÓCUS MARCADOR

(51) Int.Cl.: A01H 1/04; C12N 15/82

(30) Prioridade Unionista: 01/03/2006 US 60/778,178

(73) Titular(es): PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC. E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY

(72) Inventor(es): WILLIAM B. ALLEN; BO SHEN; MITCHELL C. TARCZYNSKI; MARK E. WILLIAMS; PEIZHONG ZHENG; GAN-YUAN ZHONG

MÉTODO PARA IDENTIFICAR UMA PRIMEIRA PLANTA DE MILHO OU UM PRIMEIRO GERMOPLASMA DE MILHO COMPREENDENDO EM SEU GENOMA UM GENE DE DIAGLICEROL O-ACILTRANSFERASE DO TIPO 1 (DGAT), POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PLANTA OU PARTE DE PLANTA POSSUINDO UM FENÓTIPO SELECIONADO, MÉTODO PARA IDENTIFICAR A PRESENÇA DE UM LÓCUS MARCADOR

CAMPO DA INVENÇÃO

[001]A invenção relaciona-se ao campo de reprodução de plantas e manipulação genética de plantas, particularmente para a modulação do conteúdo de óleo e conteúdo oleico em uma planta ou parte desta planta.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002]Mais de 50% da safra de grão de milho produzida nos EUA é usada para alimentação de animais (Perry (1988) *Corn and Corn Improvement*, eds., Sprague and Dudley (Madison, WI), páginas 941-963). O grão de milho com elevada concentração de óleo possui um maior conteúdo calórico comparado com grão de milho padrão e é vantajoso como uma fonte alimentar para animais. A alimentação de suínos e aves domésticas com grão de milho de alto conteúdo de óleo em vez de grão de milho com níveis padrões de concentração de óleo resultou em ganho de peso acelerado (Han e outros (1987) *J. Poult. Sci.* 66:103-111 and Gross e outros (1992) *Proc. of the 47th Ann. Corn and Sorghum Res. Conference*, páginas 82-92). Assim, o desenvolvimento de germoplasma com alto teor de óleo é um objetivo de alguns programas de reprodução de milho.

[003]A tecnologia de marcador molecular tem permitido a associação de marcadores de DNA com importantes traços agornômicos tal como rendimento, altura de planta,

resistência à doenças, etc. Métodos e composições que melhoram o conteúdo de óleo de plantas e também fornecem novos marcadores moleculares que consideram métodos de reprodução eficientes para identificar as plantas de alto teor de óleo são necessários na técnica.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[004] Composições relacionadas ao *locus* 6 de traço quantitativo (QTL6) em milho e métodos para seu uso são fornecidos. As composições são *loci* marcadores moleculares novos que são geneticamente ligados ao QTL6 e que estão associados ao conteúdo de óleo aumentado e/ou conteúdo de ácido oléico aumentado de uma planta ou parte desta planta, e/ou uma relação entre ácido oléico/ácido linoleico aumentada em uma planta ou parte desta planta. Estes novos marcadores são caracterizados pela presença de pelo menos um polimorfismo relativo ao *locus* marcador correspondente da região de QTL6 de pé de milho com conteúdo de óleo normal. Em algumas modalidades, os novos *loci* marcadores compreender codificar seqüência para um polipeptídeo, onde pelo menos um polimorfismo dentro do *locus* marcador resulta na expressão de um polipeptídeo variante que está associado ao conteúdo de óleo aumentado, e/ou conteúdo de ácido oléico aumentados, e/ou uma relação entre ácido oleico/ácido linoleico aumentada dentro da planta ou parte desta planta. Em tal modalidade, o *locus* marcador compreende uma seqüência codificadora para um DGAT1-2 de milho ou variante biologicamente ativa deste, part o DGAT1-2(ASK) de milho ou variante biologicamente ativa deste. Os *loci* marcadores da invenção e fragmentos adequados destes, são úteis na seleção assitida por marcador de uma planta,

por exemplo, um pé de milho, ou parte da planta, possuindo um conteúdo de óleo aumentado, e/ou conteúdo de ácido oléico aumentado, e/ou uma relação entre o ácido oleico e o ácido linoleico, e para reprodução assistida por marcador do alto traço de óleo e/ou alto traço de ácido oléico, incluindo conteúdo de ácido oleico aumentado e relação aumentada entre o ácido oléico/ácido linoléico.

[005] Desta forma, a presente invenção fornece métodos para identificar um pé de milho ou germoplasma de milho que possua um conteúdo de óleo aumentado, um conteúdo de ácido oléico aumentado, e/ou uma relação aumentada entre o ácido oléico/ácido linoléico, os métodos compreendendo detectar na planta pi germoplasma pelo menos um polimorfismo em de um *lócus* marcador da invenção que esteja associado com o conteúdo de óleo aumentado, o conteúdo de ácido oléico aumentado ou a relação aumentada entre o ácido oléico/ácido linoléico. Em algumas modalidades, a detecção compreende o uso de um marcador detectável compreendendo todo ou parte do *lócus* marcador ou de um complemento deste. Plantas ou germoplasmas identificados como possuindo o traço de alto teor de óleo desejável, e/ou o traço de alto teor de ácido oléico, e/ou o traço de relação aumentada entre o ácido oléico/ácido linoléico podem ser selecionadas para uso em métodos de reprodução tradicionais para introduzir o traço desejado em qualquer planta ou germoplasma adequados de interesse.

[006] A presente invenção também fornece métodos para identificar a presença de um *lócus* QTL6 que esteja associado a um conteúdo de óleo aumentado, um conteúdo de ácido oléico aumentado e/ou uma relação aumentada entre o

ácido oléico/ácido linoléico em um pé de milho ou germoplasma de milho. Os métodos compreendem medir a concentração de ácido oléico da semente do referido pé de milho ou germoplasma de milho, onde uma concentração de ácido oléico de pelo menos 35% é indicativa que de o pé de milho ou germoplasma de milho provavelmente compreendem este *lócus* QTL6. Plantas ou germoplasmas identificados como possuindo o *lócus* QTL6 de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico desejável pode ser selecionada para uso em métodos de procriação tradicionais para introduzir este *lócus* desejado em qualquer planta ou germoplasma adequados de interesse.

[007]As composições da invenção também compreendem polinucleotídeos isolados por cinco quadros de leitura abertos em uma região de QTL6 de milho aqui divulgada e os polipeptídeos codificados por estes. Os cinco quadros de leitura abertos codificam um DGAT de milho, designado ZmDGAT1-2(ASK); uma permease 1 de aminoácido de milho, designada ZmAAP 1; uma proteína do sistema de efluxo de potássio de milho, designada ZmPESP, uma proteína S24 ribossomal de milho, designada ZmS24, um transportador ABC tipo PDR de milho, designado ZmABCT e variantes biologicamente ativas destes. É também fornecido o quadro de leitura aberto que condifica o ZmDGAT1-2 correspondente das linhas consaguíneas de milho de teor de milho normais e o polipeptídeo codificado por este. Adicionalmente, a invenção fornece sequencias promotoras isoladas para o gene ZmDGAT1-2(ASK), para um gene DGAT 1-2 de teor de óleo normal correspondente, designado ZmDAGT1-2(Mol7), e para os genes ZmAAP 1, ZmPESP(Mol7) e ZmPESP(ASK), ZmS24 e ZmABCT

da invenção. Estas seqüências promotoras encontram uso no direcionamento da expressão de polinucleotídeos operativamente ligados que condificam polipeptídeos de interesse, incluindo os respectivos polinucleotídeos nativos codificando os polipeptídeos ZmDGAT1-2 (ASK), ZmDGAT1-2 (Mol7), ZmAAP 1, ZmPESP, ZmS24, e ZmABCT de interesse.

[008]As composições da invenção encontram uso na manipulação de óleo, e/ou conteúdo de ácido oléico e/ou relação entre ácido oléico/ácido linoleico dentro de uma planta de interesse ou parte da planta. Desta forma, a presente invenção também fornece cassetes de expressão compreendendo um ou mais polinucleotídeos da invenção, e células de planta transformadas, plantas e semente compreendendo estes cassetes de expressão. Os cassetes de expressão encontram uso em métodos da invenção direcionadas para aumentar o conteúdo de óleo, aumentar o conteúdo de ácido oléico e/ou aumentar a relação entre ácido oléico/ácido linoleico em uma planta ou parte desta planta.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[009]A Figura 1 mostra o mapeamento de QTL6 em uma população BC2.

[010]A Figura 2 é um desenho esquemático ilustrando o mapeamento progressivo de QTL6 de uma região de 47,2 cM em BC2 abaixo de um fragmento de aproximadamente 195 kb em BC4S2, que corresponde a três clones BAC se sobrepondo (b121c.n3, b33a.k3 e be46c.n5) em um mapa físico de Mol7 consanguíneo.

[011]A Figura 3 fornece dados que mostram que o QTL6 aumenta as concentrações de óleo no embrião e semente. Em

média, 10 sementes de cada espiga homozigótica foram analisadas para óleo na semente e óleo no embrião por NMR. Para o óleo da semente, sementes secas ao ar foram usadas para medições de NMR diretas. Para o óleo do embrião, as sementes foram imersas em água durante a noite. Os embriões foram dissecados dos endospermas, secos a vácuo e submetidos a análises de NMR. QTL6 aumenta consistentemente as concentrações de óleo no embrião e de óleo na semente em várias gerações.

[012]A Figura 4 fornece dados que mostram que o QTL6 também aumenta a relação entre ácido oléico/ácido linoleico nas sementes. Em média, cinco sementes de cada espiga homozigótica foram submetidas ao perfil de ácido graxo. Porque mais de 80% do óleo de semente total é oriundo de embriões, apenas sementes inteiras foram analisadas para ácidos graxos. As sementes foram trituradas e extraídas com hexano grau HPLC. O extrato de hexano/óleo é misturado com hidróxido de trimetilsulfônio 1/10 volume em um frasco de cromatografia gasosa (GC). A composição de ácido graxo foi determinada por GC capilar em um cromatógrafo a gás modelo 6890 Agilent com detector de ionização de chama. Os ésteres metílicos de ácido graxo foram separados em uma coluna capilar ZB-Wax Zebron™. Os dados estão expressados como o percentual normalizados de todos os ésteres metílicos do ácido graxo identificado.

[013]A Figura 5 fornece dados mostrando que QTL6 de óleo e Leafy Cotyledon 1 (LEC1) possuem efeitos aditivos sobre o óleo. Cotilédone Folhoso de Milho 1 (LEC1), um ativador transcricional contendo domínio-B, mostrou aumentar o óleo do embrião. Uma linha ASKC28IBlxEF09B BC2S2

homozigótica para QTL6 foi cruzada com plantas homozigóticas contendo o transgene LEC1 de milho. O óleo de embrião e de semente das sementes F1 resultantes foram analisados por NMR. Os dados indicam que QTL6 e LEC1 possuem efeitos aditivos sobre as concentrações de óleo do embrião assim como sobre as concentrações de óleo da semente.

[014]A Figura 6 fornece um mapeamento esquemático da região de QTL6, incluindo os cinco quadros de leitura abertos (*Open Reading Frames* (ORFs)). Conforme descrito na Figura 2, um QTL de óleo/ácido oléico importante foi finalmente mapeado para uma pequena região no cromossomo 6 localizada entre os marcadores SNP BAC18 e BAC29. Três BACs sobrepostos cobrindo a região de QTL6 da linha de milho consaguínea Mo 17 foram sequenciados. A inserção genômica total nestes três clones é aproximadamente de 280 kb. QTL6 pode ser também mapeado para uma região de 195 kb que contém cinco quadros de leitura abertos (ORFs) dividindo significativa homologia com genes conhecidos. Os cinco ORFs e marcadores polimórficos ligados intimamente são marcados. Devido à natureza repetitiva do genoma de milho, alguns pequenos espaços e a orientação de alguns fragmentos devem ser determinados. Dois dos ORFs (proteína ribossomal 40S e permease de aminoácido) estão localizados dentro de um espaço de 18 kb. O ORF transportador de ABC está localizado na extremidade da região sequenciada, e apenas metade da extremidade 5' deste ORF grande (mais de 1500 AA) para o transportador de ABC está localizada nestes três BACs.

[015]A Figura 7 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6 BAC05 desenvolvido das seqüências de

extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador BAC05-ASK (Id. de Seq. nº: 1) está alinhado com a seqüência correspondente de BAC05-EF09B (Id. de Seq. nº: 2). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 68) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 69) que podem ser usados para amplificar este marcador.

[016]A Figura 8 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6 BAC05 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador BAC17-ASK (Id. de Seq. nº: 3) está alinhado com a seqüência correspondente de BAC17-EF09B (Id. de Seq. nº: 4). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 70) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 71) que podem ser usados para amplificar este marcador.

[017]A Figura 9 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6 BAC05 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo18 que cobrem a região de QTL6. O marcador BAC18-ASK (Id. de Seq. nº: 5) está alinhado com a seqüência correspondente de BAC18-EF09B (Id. de Seq. nº: 6). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 72) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 73) que podem ser usados para amplificar este marcador.

[018]A Figura 10 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6 BAC20 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador BAC20-ASK (Id. de Seq. nº: 7) está alinhado com a seqüência correspondente de BAC17-EF09B

(Id. de Seq. nº: 8). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 74) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 75) que podem ser usados para amplificar este marcador.

[019]A Figura 11 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6 BAC22 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador BAC22-ASK (Id. de Seq. nº: 9) está alinhado com a seqüência correspondente de BAC22-EF09B (Id. de Seq. nº: 10). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 76) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 77) que podem ser usados para amplificar este marcador.

[020]A Figura 12 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6 BAC24 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador BAC24-ASK (Id. de Seq. nº: 11) está alinhado com a seqüência correspondente de BAC24-EF09B (Id. de Seq. nº: 12). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 78) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 79) que podem ser usados para amplificar este marcador.

[021]A Figura 13 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6 BAC29 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador BAC29-ASK (Id. de Seq. nº: 13) está alinhado com a seqüência correspondente de BAC29-EF09B (Id. de Seq. nº: 14). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 80) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 81) que podem ser usados para

amplificar este marcador.

[022]A Figura 14 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6 BAC32 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador BAC32-ASK (Id. de Seq. nº: 15) está alinhado com a seqüência correspondente de BAC32-EF09B (Id. de Seq. nº: 16). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 82) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 83) que podem ser usados para amplificar este marcador.

[023]A Figura 15 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6SNP7 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador QTL6SNP7-ASK (Id. de Seq. nº: 17) está alinhado com a seqüência correspondente de QTL6SNP7-EF09B (Id. de Seq. nº: 18). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 84) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 85) que podem ser usados para amplificar este marcador.

[024]A Figura 16 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6SNP8 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador QTL6SNP8-ASK (Id. de Seq. nº: 19) está alinhado com a seqüência correspondente de QTL6SNP8-EF09B (Id. de Seq. nº: 20). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 86) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 87) que podem ser usados para amplificar este marcador.

[025]A Figura 17 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6SNP9 desenvolvido das seqüências de

extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador QTL6SNP9-ASK (Id. de Seq. nº: 21) está alinhado com a seqüência correspondente de QTL6SNP9-EF09B (Id. de Seq. nº: 22). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 88) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 89) que podem ser usados para amplificar este marcador.

[026]A Figura 18 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6SNP13 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador QTL6SNP13-ASK (Id. de Seq. nº: 23) está alinhado com a seqüência correspondente de QTL6SNP13-EF09B (Id. de Seq. nº: 24). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 90) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 91) que podem ser usados para amplificar este marcador.

[027]A Figura 19 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6SNP14 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador QTL6SNP14-ASK (Id. de Seq. nº: 25) está alinhado com a seqüência correspondente de QTL6SNP14-EF09B (Id. de Seq. nº: 26). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 92) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 93) que podem ser usados para amplificar este marcador.

[028]A Figura 20 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6SNP15 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador QTL6SNP15-ASK (Id. de Seq. nº: 27) está alinhado com a seqüência correspondente de

QTL6SNP15-EF09B (Id. de Seq. nº: 28). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 94) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 95) que podem ser usados para amplificar este marcador.

[029]A Figura 21 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6SNP16 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador QTL6SNP16-ASK (Id. de Seq. nº: 29) está alinhado com a seqüência correspondente de QTL6SNP16-EF09B (Id. de Seq. nº: 30). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 96) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 97) que podem ser usados para amplificar este marcador.

[030]A Figura 22 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6SNP17 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador QTL6SNP17-ASK (Id. de Seq. nº: 31) está alinhado com a seqüência correspondente de QTL6SNP17-EF09B (Id. de Seq. nº: 32). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 98) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 99) que podem ser usados para amplificar este marcador.

[031]A Figura 23 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6MZA5002 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador QTL6MZA5002-ASK (Id. de Seq. nº: 33) está alinhado com a seqüência correspondente de QTL6MZA5002-EF09B (Id. de Seq. nº: 34). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 100) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 101) que pode ser

usado para amplificar este marcador.

[032]A Figura 24 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6MZA13321 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador QTL6MZA13321-ASK (Id. de Seq. nº: 35) está alinhado com a seqüência correspondente de QTL6MZA13321-EF09B (Id. de Seq. nº: 36). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 102) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 103) que pode ser usado para amplificar este marcador.

[033]A Figura 25 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6MZA15785 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador QTL6MZA15785-ASK (Id. de Seq. nº: 37) está alinhado com a seqüência correspondente de QTL6MZA15785-EF09B (Id. de Seq. nº: 38). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 104) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 105) que pode ser usado para amplificar este marcador.

[034]A Figura 26 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6MZA13118 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador QTL6MZA13118-ASK (Id. de Seq. nº: 39) está alinhado com a seqüência correspondente de QTL6MZA13118-EF09B (Id. de Seq. nº: 40). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 106) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 107) que pode ser usado para amplificar este marcador.

[035]A Figura 27 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6MZA11771 desenvolvido das seqüências de

extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador QTL6MZA11771-ASK (Id. de Seq. nº: 41) está alinhado com a seqüência correspondente de QTL6MZA11771-EF09B (Id. de Seq. nº: 42). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 108) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 109) que pode ser usado para amplificar este marcador.

[036]A Figura 28 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6MZA9351 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador QTL6MZA9351-ASK (Id. de Seq. nº: 43) está alinhado com a seqüência correspondente de QTL6MZA9351-EF09B (Id. de Seq. nº: 44). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 110) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 111) que pode ser usado para amplificar este marcador.

[037]A Figura 29 fornece um alinhamento do marcador molecular QTL6MZA8135 desenvolvido das seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC Mo17 que cobrem a região de QTL6. O marcador QTL6MZA8135-ASK (Id. de Seq. nº: 45) está alinhado com a seqüência correspondente de QTL6MZA8135-EF09B (Id. de Seq. nº: 46). O alinhamento também fornece o iniciador de avanço (Id. de Seq. nº: 112) e o iniciador reverso (Id. de Seq. nº: 113) que pode ser usado para amplificar este marcador.

[038]A Figura 30 fornece um alinhamento da proteína ZmDGAT1-2(ASK) (Id. de Seq. nº: 48) com a proteína ZmDGAT1-2 das linhas consaguíneas de milho com teor de óleo normal (quando comparado ao amarelo #2) EF09B (Id. de Seq. nº: 52), Mo17 (Id. de Seq. nº: 50) e B73 (Id. de Seq. nº: 54).

A deleção de glutamina dentro da proteína ZmDGAT1-2(ASK) está descrita como ocorrendo na posição correspondente a Gln₆₇ da proteína ZmDGAT1-2 com teor de óleo normal, embora a deleção possa ocorrer na posição correspondente a Gln₆₄, Gln₆₅, Gln₆₆ ou Gln₆₇ da proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo. Também, a inserção de fenilalanina dentro da proteína ZmDGAT 1-2(ASK) está descrita como correspondente a uma inserção de fenilalanina entre Phe₄₆₉ e Ser₄₇₀ da proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo. Entretanto esta inserção poderá corresponder a uma inserção de fenilalanina entre Trp₄₆₇ e Phe₄₆₈ da proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo, ou uma inserção de fenilalanina entre Phe₄₆₉ e Ser₄₇₀ da proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo.

[039]A Figura 31 fornece um alinhamento da sequência codificadora para a proteína ZmDGAT1-2(ASK) (Id. de Seq. nº: 47) com a sequência codificadora para a proteína ZmDGAT1-2 das linhas consaguíneas de milho com teor de óleo normal EF09B (Id. de Seq. nº: 51), Mo 17 (Id. de Seq. nº: 49) e B73 (Id. de Seq. nº: 53). Note que neste alinhamento, a mudança polimórfica (deleção de um códon CAG dentro da sequência codificadora para ZmDGAT 1-2(ASK) exposta em Id. de Seq. nº: 47) que resulta em uma deleção de um resíduo de glutamina dentro da proteína ZmDGAT 1-2(ASK) está descrita como ocorrendo dentro do codon para o resíduo de glutamina correspondente à posição 67 da proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo. Entretanto, dado o estiramento dos quatro resíduos de glutamina repetidos dentro da proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo, a mudança polimórfica (deleção de um códon CAG) poderá ocorrer dentro do códon para o resíduo de glutamina correspondente à posição 64 da

proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo (isto é, representado pela deleção de nucleotídeos (nt) 190-192 da sequência codificadora para a proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo exposta em Id. de Seq. n°: 51, 49 ou 53), posição 65 da proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo (isto é, representada pela deleção de nt 193-195 de Id. de Seq. n°: 51, 49 ou 53), posição 66 da proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo (isto é, representada pela deleção de nt 196-198 de Id. de Seq. n°: 51, 49 ou 53), ou posição 67 da proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo (isto é, representada pela deleção de nt 199-201 de Id. de Seq. n°: 51, 49 ou 53 conforme aqui mostrado).

[040] Também, neste alinhamento, a mudança polimórfica (inserção de um códon TTC dentro da sequência codificadora para ZmDGAT1-2(ASK) exposta em Id. de Seq. n°: 47) que resulta em uma inserção do resíduo de fenilalanina dentro da proteína ZmDGAT1-2(ASK) está descrita como ocorrendo entre o códon para o resíduo de fenilalanina correspondendo à posição 469 da proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo e o códon para o resíduo de serina correspondendo à posição 470 da proteína ZmDGAT1-2 com teor de óleo normal. Entretanto, dado o estiramento de três resíduos de fenilalanina repetidos dentro da proteína ZmDGAT1-2(ASK), a mudança polimórfica (inserção de um códon TTC) poderá ocorrer entre o último nucleotídeo do códon para o resíduo de triptofano correspondente à posição 467 e o primeiro nucleotídeo do códon para o resíduo de fenilalanina correspondente à posição 468 da proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo (isto é, entre os nucleotídeos (nt) 1401 e 1402 da sequência codificadora para a proteína ZmDGAT1-2

com teor de óleo normal exposta em Id. de Seq. nº: 51, 49 ou 53), entre o último nucleotídeo do códon para o resíduo de fenilalanina correspondendo à posição 468 e o primeiro nucleotídeo do códon para o resíduo de fenilalanina correspondendo à posição 469 da proteína ZmDGAT1-2 com teor de óleo normal (isto é, entre nt 1404 e 1405 de Id. de Seq. nº: 51, 49 ou 53), ou entre o último nucleotídeo do códon para o resíduo de fenilalanina correspondendo à 469 e o primeiro nucleotídeo do códon para o resíduo de serina correspondendo à posição 470 da proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo (isto é, entre nt 1407 e 1408 de Id. de Seq. nº: 51, 49 ou 53, conforme aqui mostrado).

[041]A Figura 32 mostra os resultados da análise filogenética de DGATs e seqüências relacionadas. A análise filogenética foi executada usando-se o programa PHYLIP (J. Felsenstein, University of Washington) e exposta usando-se o programa TreeView (Página (1996) *Computer Appl. Biosci.* 12:357-358). Números de acesso são fornecidos para seqüência pública. As seqüências proprietárias são indicadas por nomes de clone de EST ou por nomes de gene Unicorn (PCOs).

[042]A Figura 33 mostra o alinhamento da seqüência de aminoácido de DGATs e aciltransferases relacionadas. O programa Vector NTI é usado para alinhamentos múltiplos com método CLUSTALW (Higgins e outros (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). Caixas maiores (numeradas 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17) indicam domínios de seqüência conservados em todos os DGAT1 da planta. As duas caixas menores (numeradas como 6 e 18) indicam domínios de seqüência únicos para todos os membros do subgrupo DGAT1-2.

[043]A Figura 34 fornece um alinhamento da proteína ZmAAP1 com outras proteínas conhecidas.

[044]A Figura 35 fornece um alinhamento da proteína ZmPESP com outras proteínas conhecidas.

[045]A Figura 36 fornece um alinhamento da proteína ZmS24 com outras proteínas conhecidas.

[046]A Figura 37 fornece um alinhamento da proteína ZmABCT com outras proteínas conhecidas.

[047]A Figura 38 fornece um alinhamento de sequência de vários elementos da família do ativador transcricional HAP3. O alinhamento fornece uma sequência de consenso e também descreve os domínios A, B e C.

[048]A Figura 39 fornece um alinhamento de sequência de vários domínios B tipo LEC-1 (levemente sombreado) e domínios B tipo não-LEC-1.

[049]A Figura 40 ilustra o mapeamento final de QTL6. O QTL6 com alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico foi previamente mapeado para uma região de aproximadamente 195 kb, contendo cinco genes. Para mapear QTL6 também, oito novos marcadores SNP (QTL6SNP7, 8, 9, 13, 14, 15, 16 e 17) dentro desta região foram desenvolvidos com base nas sequências BAC Mo17 (nem todos os marcadores são mostrados). Aproximadamente 4.000 sementes BC5S1 separadas por QTL6 foram plantadas em pequenos potes e foram desenvolvidas em uma estufa. As mudas foram genotipadas por marcadores BAC17 e BAC32 para identificação de recombinantes entre DGAT1-2 e os genes transportadores ABC tipo PDR. Um total de 90 plantas recombinantes foram indentificados e foram depois genotipadas pelos novos marcadores SNP para identificar a localização precisa de

hibridizações. As plantas recombinantes foram transferidas para potes regulares e foram auto-polinizadas para produzir sementes BC5S2. Os dados de óleo e ácido oléico foram obtidos de 14 arelha recombinantes críticas conforme descrito nos exemplos aqui abaixo.

[050]A Figura 41 mostra a concentração de óleo no embrião (A), concentração de óleo na semenete (B), concentração de ácido oléico (C) e concentração de ácido linoleico (D) para pés de milho transgênicos para o alelo ASKC28IM ou EF09B de DGAT1-2. As sementes T1 separadas foram classificadas como transgênicas ou cernes nulos usando-se fluorescência vermelha como um marcador. Métodos para análise de óleo e definição de perfil de ácido graxo são conforme descrito nos exemplos aqui abaixo. O % de mudança refere-se à diferença entre as sementes positivas para fluorescência e sementes negativas para fluorescência em linhas transgênicas ou sementes ASKC2IB1 homozigóticas contra sementes homozigóticas EF09B em BC4S2 NILs. Os dados transgênicos representam médias de 10 eventos, 10 transgênicas e 10 sementes nulas analisadas por evento. Os dados de BC4S2 representam as médias de 5 ASKC28IB1 homozigóticas e 5 EF09B NILs homozigóticas, 10 sementes por linha analisada.

[051]A Figura 42 mostra os resultados de um ensaio de atividade de DGAT (A) e acúmulo de TAG em células de levedura (B). ASK, o alelo original de DGAT1-2 cDNA isolado de ASKC28IB1 pai (ZmDGAT1-2(ASK) de Id. de Seq. n°:47). EF09B, o alelo original de DGAT1-2 cDNA isolado de EF09B pai (ZmDGAT1-2(EF09B) de Id. de Seq. n°:51). O ASK-F, o alelo ASKC28IB1 (Id. de Seq. n°: 47) com o códom para o

resíduo F469 do polipeptídeo codificado (ZmDGAT1-2(ASK) de Id. de Seq. n°:48) deletado. EF09B+F, o alelo EF09B (Id. de Seq. n°: 51) com uma inserção de um códon TTC entre o códon para F469 e o códon para S470 de Id. de Seq. n°: 52 para restaurar o resíduo de fenilalanina correspondente à inserção F469 em ZmDGAT 1-2(ASK) de Id. de Seq. n°:48. Os métodos para ensaio de DGAT e a medição da quantidade de TAG são conforme aqui descrito no exemplo aqui abaixo. Os dados da atividade de DGAT são as médias de quatro repetições. Os dados de TAG são as médias de três repetições.

[052]A Figura 43 mostra a distribuição de alelos DAGT1-2 em consanguíneos de milho selecionados. Os conteúdos de óleo do embrião e do ácido oléico para 73 consanguíneos selecionados foram determinados conforme descrito. O DNA foi extraído de discos de folha usando-se mudas de aproximadamente 3 semanas de vida. Os iniciadores DGAT1-2 (Id. de Seq. n°s: 124/125 e 126/127) foram usados para amplificar por PCR os fragmentos que abrangem as três mudanças de aminoácido na região de terminação-N de DGAT1-2(ASK) (isto é, V45G; P55S; e as deleções de Q64, Q65, Q66 ou Q67) ou a inserção de fenilalanina na posição 467, 468 ou 469 na terminação-C de DGAT1-2(ASK). Os fragmentos de PCR foram sequenciados para determinação dos alelos.

[053]A Figura 44 demonstra que QTL6 (DGAT 1-2) e FAD2 são aditivos no aumento do conteúdo de ácido oléico. QTL6+/+, alelo ASKC28IB1 homozigótico; QTL6-/-, alelo EF09B homozigótico; FAD2 +/+, alelo favorável homozigótico; FAD2-/-, alelo não favorável homozigótico. A concentração de ácido oléico foi determinada usando-se extração com hexano

e GC conforme descrito nos exemplos aqui abaixo. O resíduo de semente restante da extração com hexano foi usado para isolamento de DNA com Qiagen's DNeasy Plant Mini Kit (Cat. No. 69104). Os alelos DGAT 1-2 e FAD2 foram determinados por amplificação por PCR gene específica e análise de marcador CAP.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[054]A presente invenção será agora descrita mais completamente aqui após com referência aos exemplos em anexo, que estão mostrados em algumas mas não em todas as modalidades da invenção. Realmente, esta invenção pode ser incorporada em muitas diferentes formas e não deve ser interpretada como limitada às modalidades expostas aqui, em vez disso, estas modalidades são fornecidas de forma que esta divulgação satisfaça as exigências legais aplicáveis. Números parecidos referem-se a elementos semelhantes por toda a divulgação.

[055]Muitas modificações e outras modalidades da invenção expostas aqui virão à mente daqueles habilitados na técnica à qual esta invenção pertence possuindo o benefício dos ensinamentos apresentados nas descrições supracitadas. Portanto, deve-se compreender que a invenção não está limitada às modalidades específicas divulgadas e que modificações e outras modalidades são objetivadas para estarem inclusas dentro do escopo das reivindicações em anexo. Embora termos específicos sejam aqui empregados, eles são usados em um sentido genérico e descritivo apenas e não para propósitos de limitação.

[056]Os artigos "um" e "uma" são usados aqui para se referirem a um ou a mais de um (isto é, a pelo menos um) do

objeto gramatical do artigo. Por meio de exemplo, "um elemento" significa um elemento ou a mais de um elemento.

I. Visão Geral

[057]Um "locus de traço quantitativo" ou "QTL" refere-se a uma localização geneticamente definida para uma coleção de um ou mais genes (alelos) que contribuem para uma característica observada. A presente invenção desenvolveu linhas isogênicas próximas para QTL6, que é um QTL de óleo notável, e demonstrou que o QTL6 é um QTL principal no controle das concentrações de óleo do embrião e concentrações de ácido oléico, e portanto a relação entre ácido oléico e ácido linoleico. Vários métodos e composições para a reprodução e manipulação de QTL6 são fornecidos. As composições compreendem novos *loci* marcadores que se separam do QTL6, e métodos de emprego destes marcadores nos programas de reprodução de milho assitidos por marcador para identificar os pés de milho e os germoplasmas que possuem conteúdo de óleo aumentado, um conteúdo de ácido oléico aumentado, ou uma relação entre ácido oléico e ácido linoleico aumentada são fornecidos. A presente invenção também mapeia QTL6 a uma região de aproximadamente 195 kb que compreende múltiplos quadros de leitura abertos, que são caracterizados em maiores detalhes abaixo. Os polinucleotídeos e polipeptídeos associados com QTL6 podem ser usados em vários métodos para aumentar o conteúdo de óleo e/ou o conteúdo de ácido oleico em uma planta de interesse, e/ou para aumentar o conteúdo de ácido oléico em relação ao conteúdo de ácido linoléico, e portanto fornecer uma relação entre ácido oléico e ácido linoléico maior. De interesse particupar à presente

invenção são os novos *loci* marcadores que são associados com um alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico e/ou alta relação de fenótipo entre ácido oléico e ácido linoléico, e que segregam geneticamente a região de QTL6 que é flanqueada por uma primeira sequência de borda que compreende os nucleotídeos 1-10 de Id. de Seq. nº:2, aqui referida como "borda de BAC05", e uma segunda sequência de borda que compreende os nucleotídeos 477-496 de Id. de Seq. nº:46 aqui referida como "borda de MZA8135". Também de interesse à presente invenção são os novos *loci* marcadores mapeados dentro uma região também definida dentro desta região de QTL6, onde a região também definida compreende uma primeira sequência de borda que compreende os nucleotídeos 1-20 de Id. de Seq. nº:6 (referida como "borda esquerda de QTL6 de BAC18"; ver Figura 6) e uma segunda sequência de borda que compreende os nucleotídeos 482-501 de Id. de Seq. nº:14 (referida como "borda direita de QTL6 de BAC29"; ver Figura 6). Também de interesse à presente invenção é um novo *locus* marcador mapeado dentro de uma segunda região também definida dentro desta região de QTL6, onde a segunda região também definida compreende uma primeira sequência de borda que compreende nucleotídeos 1-20 de Id. de Seq. nº:10 (referida como "borda esquerda de QTL6 de BAC22"; ver Figura 11) e uma segunda sequência de borda que compreende os nucleotídeos 488-507 de Id. de Seq. nº: 4 (referida como "borda direita de QTL6 de BAC17").

[058]Consequentemente, a presente invenção fornece novas técnicas de reprodução, plantas e partes de planta, junto com nocos polinucleotídeos e polipetídeos, cada um dos quais pode ser empregado para aumentar o conteúdo de

óleo, aumentar o conteúdo de ácido oléico, e/ou aumentar a relação entre ácido oléico e ácido linoléico em uma planta ou parte de planta. Conforme aqui usado, a expressão "conteúdo de óleo crescente" inclui qualquer aumento no nível de óleo na planta ou parte desta planta, por exemplo, na semente ou cerne e/ou no embrião ou germe, ou qualquer combinação destes. Em modalidades específicas, o aumento em óleo ocorre no germe e/ou no cerne. Por exemplo, o conteúdo de óleo aumentado pode compreender um aumento total no conteúdo de óleo na planta ou parte desta planta de cerca de 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120% ou mais quando comparado a uma planta ou parte desta planta de controle. Alternativamente, o nível aumentado de óleo pode incluir cerca de 0,5 vez, 1 vez, 2 vezes, 4 vezes, 8 vezes, 16 vezes, 32 vezes ou mais de aumento total no nível de óleo na planta ou parte desta planta quando comparado a um controle de planta ou parte desta planta.

[059]Os níveis dos vários constituintes no óleo podem também ser modulados usando-se os vários métodos e composições da invenção. Por exemplo, a expressão "conteúdo de ácido oléico crescente" inclui qualquer aumento no nível de ácido oléico ou qualquer alteração na relação entre ácido oléico e outros constituintes de óleo em uma planta ou parte desta planta, por exemplo, a semente ou cerne e/ou o embrião ou germe, ou qualquer combinação destes. Por exemplo, o conteúdo de ácido oléico crescente pode compreender um aumento no nível de ácido oléico total de cerca de 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120% ou mais quando comparado a uma

planta ou parte desta planta de controle. Alternativamente, o nível aumentado de ácido oléico pode incluir cerca de 0,5 vez, 1 vez, 2 vezes, 4 vezes, 8 vezes, 16 vezes, 32 vezes ou mais de aumento no nível de ácido oléico na planta ou parte desta planta quando comparado a um controle de planta ou parte desta planta.

[060]A ligação simples delta-12 de ácido oléico (C18:1) pode ser convertida em uma ligação dupla conjugada, produzindo assim ácido linoléico (C18:2). Portanto, um conteúdo de ácido oléico crescente pode também modular a relação entre ácido oléico e ácido linoléico em uma planta ou parte desta planta. Desta maneira, os métodos e composições da presente invenção podem ser usados para aumentar a relação entre ácido oléico e ácido linoléico em uma planta ou parte desta planta. Por exemplo, a expressão "relação entre ácido oléico e ácido linoléico crescente" inclui qualquer aumento na relação entre ácido oléico e ácido linoléico em uma planta ou parte desta planta, por exemplo, a semente ou cerne e/ou o embrião ou germe, ou qualquer combinação destes. Assim, por exemplo, relação entre ácido oléico e ácido linoléico em uma planta ou parte desta planta pode ser aumentada em cerca de 0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120% ou mais quando comparada a uma planta ou parte desta planta de controle. Alternativamente, relação aumentada entre ácido oléico e ácido linoléico pode incluir cerca de 0,5 vez, 1 vez, 2 vezes, 4 vezes, 8 vezes, 16 vezes, 32 vezes ou mais de aumento relação entre ácido oléico e ácido linoléico na planta ou parte desta planta quando comparado a um controle de planta ou parte desta planta. Métodos de

análise para os níveis de ácido oléico e o ácido linoléico são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, a Publicação do Pedido de Patente U. S. de número 20050160494, aqui incorporada por referência integralmente. Usando-se os métodos e composições aqui divulgados, a produção total de óleo pode ser aumentada e/ou as características do óleo podem ser modificadas.

[061]O óleo e/ou os constituintes do óleo, tal como ácido oléico e ácido linoleico, podem ser medidos por qualquer método conhecido na técnica. A fim de se fazer uma determinação da quantidade de óleo nas sementes e/ou a quantidade de ácidos graxos específicos presentes no óleo e suas respectivas concentrações, sementes maduras podem ser trituradas (por exemplo, em uma prensa hidráulica), e o óleo endógeno pode ser facilmente extraído com hexano ou por quaisquer outras técnicas adequadas de acordo com os procedimentos conhecidos na técnica. Similarmente, qualquer tecido de planta pode ser triturado ou mopido e então extraído com hexano para recuperar o óleo.

[062]O hexano pode ser separado do óleo por evaporação, e a quantidade de óleo restante foi determinada. Os ácidos graxos podem ser determinados seguindo-se a transmetilação. Os ésteres metílicos resultantes dos ácidos graxos podem ser separados e suas concentrações determinadas pelo uso de cromatografia a gás capilar de acordo com os procedimentos operacionais padrões conhecidos na técnica. Além disso, a quantificação do conteúdo de óleo das sementes pode ser executada com métodos convencionais, tais como análise por infravermelho (MR), imagem por ressonância magnética nuclear (NMR),

extração com extrator Soxhlet, extração acelerada com solvente (ASE), extração com microondas, e extração com fluido super crítica. A espectroscopia por infravermelho próximo (NIR) tornou-se um método padrão para selecionar amostras de semente sempre que a amostra de interesse for receptiva a esta técnica. As amostras estudadas incluem trigo, milho, soja, canola, arroz, alfafa, aveia e outros. Métodos de medição do óleo e constituintes de óleo em cernes de milho, germe dissecado e endosperma são divulgados, por exemplo, em WO 2005/003312 e WO 02/062129, aqui incorporados por referência integralmente.

II. Caracterização de QTL6

(A) Locus marcador para QTL6

[063] Composições compreendendo marcadores para o *locus* QTL6 são fornecidas. Conforme aqui usado, um "marcador genético" é qualquer diferença fenotípica morfológica, bioquímica ou baseada em ácido que revela um polimorfismo de DNA. Exemplos de marcadores genéticos incluem, mas não estão limitados a RFLPs (polimorfismos de comprimento de fragmento por restrição), RAPDs (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente), polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), alozimas, SSRs (repetições de sequência única) e AFLPs (polimorfismos de comprimento de fragmento por amplificação). O termo "*locus* marcador" refere-se a uma localização geneticamente definida de um polimorfismo de DNA. Tais *loci* marcadores podem ser usados como um ponto de referência quando se identificam geneticamente os *loci* marcadores.

[064] Um "mapa genético" é uma descrição das relações de ligação genética entre os *loci* em um ou mais cromossomos

(ou grupos de ligação) dentro de uma dada espécie, geralmente descrita de uma forma diagramática ou em tabela. O "mapeamento" é o processo de definição das relações de ligação dos loci através do uso de marcadores genéticos, população que segrega os marcadores, e princípios genéticos padrões de frequência de recombinação. Uma "localização no mapa" é uma localização determinada em um mapa genético relativa aos marcadores genéticos ligados onde um marcador específico pode ser encontrado dentro de uma dada espécie.

[065] Os métodos e composições da invenção requerem detecção de pelo menos um polimorfismo ou qualquer combinação dos polimorfismos dentro de um *lócus* marcador favorável aqui divulgado. O termo "*lócus* marcador favorável" refere-se a um *lócus* marcador que se segrega geneticamente com a região de QTL6 aqui divulgada e que está associada com o traço fenotípico da planta desejável de alto conteúdo de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico e/ou relação entre ácido oléico e ácido linoléico aumentada dentro da planta ou uma ou mais partes de planta desta. Exemplos não limitantes das seqüências correspondentes a estes *loci* marcadores favoráveis são fornecidos em Id. de Seq. n^{os}: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 e 51 com pelo menos um polimorfismo contido neste. Exemplos de polimorfismos específicos dentro de cada *lócus* marcador favorável da região de QTL6 são identificados na Tabela 2 (*loci* marcadores não codificadores) e Tabela 3 (*lócus* marcador compreendendo a seqüência codificadora) nos Exemplos 2 e 4 aqui abaixo. Exemplos não limitantes de seqüências para *loci* marcadores favoráveis da invenção são expostos em Id.

de Seq. n^{os}: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 e 47 e o(s) respectivo(s) polimorfismo(s) que ocorre(m) dentro destes loci marcadores favoráveis são mostrados nas Tabelas 2 e 3 aqui abaixo. Veja também os alinhamentos mostrados nas Figuras 7-29 e 31.

[066]Conforme aqui usados, um "alelo de um *locus* marcador" é um de uma pluralidade de seqüências de nucleotídeo polimórficas em um *locus* marcador. Para os propósitos da presente invenção, um "alelo de um *locus* marcador favorável da invenção" compreende pelo menos uma das mudanças polimórficas encontradas no *locus* marcador favorável. Conseqüentemente, um alelo do *locus* marcador favorável pode ter pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais nucleotídeos polimórficos encontrados no *locus* marcador favorável aqui divulgado. Assim, um alelo de um *locus* marcador pode ter pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüência ao *locus* marcador favorável aqui divulgado.

[067]No contexto da presente invenção, um *locus* marcador pode estar associado com um outro *locus* marcador, com algum outro *locus* genético (por exemplo, um *locus* de alto teor de óleo e/ou um *locus* de alto teor de ácido oléico, tal como QTL6) e/ou com um traço (isto é, alto conteúdo de óleo, alto conteúdo de ácido oléico, e/ou alta relação entre ácido oléico e ácido linoléico). Por "associado com " pretende-se dizer que o *locus* marcador e o segundo *locus* marcador ou o *locus* marcador e o *locus* genético estão no mesmo grupo de ligação e estão em desequilíbrio de ligação entre si. "Desequilíbrio de

ligação" é definido como a segregação não aleatória de alelos em dois ou mais *loci*. O desequilíbrio de ligação portanto descreve uma situação em que a combinação de alelos ou marcadores genéticos ocorre mais freqüentemente em uma população do que seria esperado a partir de uma formação aleatória de haplótipos de alelos baseados em suas frequências. O termo "geneticamente ligado" refere-se aos *loci* genéticos que estão em desequilíbrio de ligação e foram estatisticamente determinados para não serem classificados independentemente. Os *loci* geneticamente ligados reúnem mais de 50% do tempo.

[068]Conforme aqui usado, um marcador que é geneticamente ligado a um outro marcador do *lócus* genético estará no mesmo grupo de ligação e tipicamente dentro de 10 centimorgans (cM) entre si. Por exemplo, um *lócus* marcador da presente invenção está associado com o traço de alto conteúdo de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico e/ou relação aumentada entre ácido oléico e ácido linoleico se o marcador e a seqüência que confere o traço fenotípico de alto conteúdo de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico e/ou relação aumentada entre ácido oléico e ácido linoleico não estão mais de 10 cM, 9 cM, 8 cM, 7 cM, 6 cM, 5 cM, 4 cM, 3 cM, 2 cM, 1 cM, 0,75 cM, 0,5 cM, 0,25 cM afastadas no mesmo grupo de ligação. Isto é, os dois elementos genéticos associados passam por recombinação durante a meiose entre si a uma frequência de menos de ou igual a cerca de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25% ou menos. Espera-se que cada um dos marcadores identificados esteja em proximidade física ou genética (resultando na ligação física e/ou genética) em relação a um elemento

genético (QTL6) que contribui para um conteúdo de óleo aumentado e/ou conteúdo de ácido oléico aumentado e/ou relação entre ácido oléico e ácido linoléico aumentada.

[069]Conforme aqui usado, o termo "intimamente ligado" significa que a recombinação entre dois loci ligados ocorre com uma frequência de cerca de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25% ou menos. Em outras palavras, os loci intimamente ligados co-segregam pelo menos 90% do tempo. Assim, os loci marcadores intimamente ligados da invenção, são suficientemente próximos ao traço que confere conteúdo de óleo aumentado e/ou conteúdo de ácido oléico aumentado e/ou relação aumentada entre o ácido oléico/ácido linoléico de forma que eles podem ser usados como um instrumento de previsão para o próprio traço.

[070]Em uma modalidade, o locus marcador favorável geneticamente ligado ao QTL6 compreende o polinucleotídeo exposto em qualquer uma das Id. de Seq. n^{os}: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 e 45. Os loci marcadores favoráveis expostos em Id. de Seq. n^{os}: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 e 45, que estão associados com o traço fenotípico de alto conteúdo de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico e/ou relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico, estão alinhados nas Figuras 7-29 com a sequência para o locus marcador correspondente para a linha consanguínea de milho EF09B (teor normal de óleo). A presente invenção também fornece alelos de locus marcador geneticamente ligado a QTL6.

[071]Em outras modalidades, o locus marcador favorável é um ácido nucleico expressado que está associado com o

traço fenotípico de alto conteúdo de óleo desejável e/ou o alto conteúdo de ácido oléico e/ou relação aumentada entre o ácido oléico/ácido linoléico. Em ainda outras modalidades, o *locus* marcador favorável está dentro do polinucleotídeo codificado DGTA, por exemplo, dentro do polinucleotídeo codificando DGAT1-2. Por exemplo, o *locus* marcador favorável pode compreender um polimorfismo no polinucleotídeo codificando ZmDGAT1-2 (por exemplo, a seqüência codificadora exposta em Id. de Seq. nº:51) onde a mudança polimórfica à seqüência codificadora de ZmDGAT1-2 resulta em uma substituição do resíduo de glicina pelo resíduo de serina na posição do aminoácido correspondente ao resíduo 45 de Id. de Seq. nº:52; uma substituição do resíduo de serina pelo resíduo de prolina na posição do aminoácido correspondente ao resíduo 55 de Id. de Seq. nº:52; uma deleção do resíduo de glutamina correspondente àquela posição do aminoácido 64, 65, 66 ou 67 de Id. de Seq. nº:52; e/ou uma inserção de um resíduo de fenilalanina em uma posição localizada entre um par de resíduos, onde o par de resíduos corresponde a um par de resíduos dentro de Id. de Seq. nº:52 selecionado a partir do grupo consistindo de: (a) o resíduo de triptofano na posição 467 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52 e o resíduo de fenilalanina na posição 468 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52, (b) o resíduo de fenilalanina na posição 468 do aminoácido de Id. de Seq. nº: 52 e o resíduo de fenilalanina na posição 469 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52, e (c) o resíduo de fenilalanina na posição 469 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52. Um exemplo não limitante de um *locus* marcador favorável dentro de um polinucleotídeo codificando DGAT 1-2

é uma sequência compreendendo a sequência exposta em Id. de Seq. nº:47, que codifica a proteína ZmDGAT1-2(ASK) exposta em Id. de Seq. nº:48. As mudanças polimórficas específicas para a sequência codificadora para a proteína ZmDGAT1-2(ASK) de Id. de Seq. nº:48 são exemplificados na Figura 31 (ver também a descrição para esta figura fornecida aqui acima), e descrito na Tabela 3 aqui abaixo. Ver também o alinhamento da proteína ZmDGAT1-2(ASK) com a proteína ZmDGAT1-2 a partir de três linhas consanguíneas de milho com teor de óleo normal (Figura 30) e a descrição para esta figura aqui fornecida acima.

[072]Qualquer um habilitado na técnica irá avaliar que os *loci* marcadores aqui fornecidos e discutidos são meramente exemplares e que outros numerosos *loci* marcadores podem ser identificados com base na ligação genética e/ou proximidade física de um cromossomo aos *loci* marcadores aqui fornecidos. Assim as composições e métodos da presente invenção aqui descritos não são objetivados para serem limitados aos *loci* marcadores favoráveis compreendendo Id. de Seq. nºs:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 e 51 com pelo menos um polimorfismo contido neste, ou aos exemplos de sequências para estes *loci* marcadores favoráveis conforme exposto em Id. de Seq. nºs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, e 47, mas também incluem marcadores adicionais ligados a ele. Adicionalmente, embora alelos favoráveis dos *loci* marcadores exemplares estejam aqui divulgados, será facilmente avaliado por aqueles habilitados na técnica, que os alelos favoráveis dos *loci* adicionais ligados aos *loci*

marcadores aqui descritos podem ser determinados sem experimentação indevida e empregados nas composições e métodos da presente invenção. Conseqüentemente, qualquer *locus* marcador ligado aos *loci* marcadores aqui descritos e localizados em um segmento de cromossomo identificado pelos *loci* marcadores da invenção, pode também ser usado para identificar este segmento de cromossomo, e para definir o genótipo de uma planta de interesse, ou para selecionar as formas alélilas favoráveis de um segmento de cromossomo correlacionado com o traço fenotípico de alto conteúdo de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico e/ou relação aumentada entre o ácido oléico e o ácido linoléico.

[073] Pelo menos um dos polimorfismos presentes em um ou mais *loci* marcadores favoráveis aqui divulgados pode ser usado para identificar uma primeira planta de milho ou um primeiro germoplasma de milho que possui um alto conteúdo de óleo ou um conteúdo de ácido oléico aumentado ou uma relação aumentada entre o ácido oléico/ácido linoléico, e portanto compreende o traço fenotípico de alto conteúdo de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico e/ou uma relação aumentada entre o ácido oléico/ácido linoléico. Desta maneira, a presente invenção fornece tal método de identificação, compreendendo detectar no primeiro pé de milho ou no primeiro germoplasma de milho pelo menos um polimorfismo dentro de um ou mais dos *loci* marcadores favoráveis que estão associados com o traço de conteúdo de óleo aumentado, conteúdo de ácido oléico aumentado e/ou relação aumentada entre o ácido oléico/ácido linoléico. Nas modalidades específicas, os polimorfismos do marcador de um ou mais *locus* marcador podem ser empregados. Assim,

aspectos da invenção usam uma coleção de diferentes *loci* marcadores. O número de *loci* marcadores em tal coleção irá variar e será, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ou maior.

[074]Vários métodos são conhecidos na técnica para detectar o *locus* marcador favorável da presente invenção. A detecção de pelo menos um polimorfismo do *locus* marcador favorável pode incluir, mas não está limitada à detecção de um ou mais dos polimorfismo por polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), extensão de base única, eletroforese, alinhamento de sequência, hibridização de oligonucleotídeo alelo específico (ASO), RAPD, detecção de sequências variáveis amplificadas do genoma de planta, detecção de repetições de sequência simples (SSRs), e detecção de polimorfismo de nucleotídeo simples (SNPs), etc. Ensaios de marcador incluem extensão de base única conforme divulgado na Patente U. S. de número 6.013.431 e discriminação alélica onde a atividade da endonuclease libera um corante repórter a partir de um marcador de hibridização conforme divulgado na Patente U. S. de número 5.538.848, cujas divulgações estão aqui incorporadas por referência.

[075]Iniciadores de amplificação para amplificar os *loci* marcadores favoráveis e marcadores adequados para detectar os *loci* marcadores favoráveis são fornecidos. As Figuras 7-29 e Id. de Seq. n^{os}: 68-115 fornecem iniciadores específicos que podem ser usados para amplificar os respectivos *loci* marcadores da invenção. Qualquer um habilitado na técnica irá reconhecer que outras sequências em qualquer um dos lados dos dados iniciadores podem ser

usadas no lugar dos dados iniciadores, contanto que os iniciadores possam amplificar o alelo desejado de um *locus* marcador favorável da invenção. Além disso, marcadores para estes *loci* favoráveis são também fornecidos. Assim, a presente invenção não é limitada aos iniciadores e marcadores especificamente aqui citados.

[076] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um polinucleotídeo isolado compreendendo pelo menos 12 nucleotídeos consecutivos, onde a referida seqüência dos referidos 12 nucleotídeos consecutivos compreende pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or 100% de identidade de seqüência em relação ao complemento de um alelo de um *locus* marcador favorável compreendendo uma seqüência exposta em Id. de Seq. n°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 ou 47 onde o referido polinucleotídeo pode detectar um polimorfismo em um *locus* marcador favorável associado com alto conteúdo de óleo, alto conteúdo de ácido oléico e/ou alta relação entre o ácido oléico/ácido linoléico. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo isolado compreende pelo menos 12 nucleotídeos consecutivos da seqüência exposta em Id. de Seq. n°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 ou 47 . Em outras modalidades, o polinucleotídeo isolado compreende um marcador detectável. O marcador detectável pode ser, por exemplo, um elemento radioativo ou um corante. Em algumas modalidades, o iniciador ou marcador da invenção também compreendem um marcador fluorescente e uma têmpera, por exemplo, para uso nos ensaios de marcador de hibridização dos tipos conhecidos como ensaios Taqman,

disponíveis a partir de Applied Biosystems (Foster City, California).

(B) Reprodução de Planta

[077]Os *loci* marcadores favoráveis da invenção podem ser usados na seleção de plantas assistida por marcador que possuem o fenótipo de alto teor de óleo desejado, e/ou fenótipo de alto teor de ácido oléico e/ou fenótipo de alto teor de ácido/baixo teor de ácido linoléico (isto é, relação aumentada entre o ácido oléico/ácido linoléico) e subsequente reprodução destas plantas selecionadas para obter linhas genéticas de planta e/ou variedades possuindo o fenótipo de alto teor de óleo desejado e/ou fenótipo de alto teor de ácido oléico e/ou fenótipo de alto teor de ácido/baixo teor de ácido linoléico.

[078]O termo "germoplasma" refere-se a um indivíduo, um grupo de indivíduos, ou um clone representando um genótipo, variedade, espécie ou cultura, ou o material genético deste.

[079]Um "genótipo" é a constituição genética de um indivíduo (ou um grupo de indivíduos) em um ou mais *loci* genéticos. Genótipo é definido pelo(s) alelo(s) de um ou mais *loci* conhecidos que o indivíduo herdou de seus pais. Um "halótipo" é o genótipo de um indivíduo em uma pluralidade de *loci* genéticos. Tipicamente, os *loci* genéticos descritos por um halótipo são fisicamente e geneticamente ligados, isto é, no mesmo segmento do cromossomo.

[080]Um indivíduo é "homozigoto" se o indivíduo possui apenas um tipo de alelo em um dado locus (por exemplo, um indivíduo diplóide com duas cópias do mesmo alelo em um

locus). Um indivíduo é "heterozigoto" se mais de um tipo de alelo está presente em um dado *locus* (por exemplo, um indivíduo diplóide com uma cópia de cada um dos dois alelos diferentes). O termo "homogeneidade" indica que elementos de um grupo possuem o mesmo genótipo em um ou mais *loci* específicos. Contrariamente, o termo "heterogeneidade" é usado para indicar que os indivíduos dentro do grupo diferem em genótipo em um ou mais *loci* específicos.

[081]Uma "linha" ou "cepa" é um grupo de indivíduos de ascendência idêntica que são geralmente consanguíneos em algum grau e que são geralmente isogênicos ou quase isogênicos.

[082]A expressão linhas "quase isogênicas" refere-se a linhas que são geneticamente similares entre si exceto em um ou em um pequeno número de *loci* genéticos (por exemplo, em 1, 2 ou cerca de 5 a cerca de 10 *loci* genéticos específicos). Estas podem ser criadas conforme descrito para sublinhas baseadas em marcador ou baseadas em diferenças para qualquer traço qualitativo que pode servir como um marcador genético efetivo. O percentual de similaridade entre linhas quase isogênicas é uma função da similaridade dos pais da cruz original e a geração em que a auto-polinização é executada. Em média, o parentesco entre os elementos de uma dada linha consanguínea aumenta 50% com cada ciclo de procriação consanguínea, devido a um aumento de 50% na homozigosidade em cada ciclo de procriação consanguínea. A similaridade percentual pode ser mais precisamente determinada com marcadores genéticos que se estendem sobre o genoma. Em alguns casos, linhas quase isogênicas diferem entre si em um *locus* genético definido.

[083]Uma "linha elite" ou "cepa elite" é uma linha agronomicamente superior que resultou de muitos ciclos de reprodução e seleção para performance agronômica superior. Similarmente, um "germoplasma elite" é um germoplasma agronomicamente superior, tipicamente derivado de e/ou capaz de dar origem a uma planta com performance agronômica superior, tal como uma linha elite de milho existente ou recentemente desenvolvida.

[084]Linhas de milho consanguíneas são tipicamente desenvolvidas para uso na produção de híbridos de milho e para uso como germoplasma em populações de reprodução para a criação de novas e distintas linhas de milho consanguíneas. Linhas de milho consanguíneas são muitas vezes usadas como alvos para a introgressão de novos traços através de técnicas de reprodução tradicionais e/ou técnicas de introgressão molecular. Linhas de milho consanguíneas necessitam ser altamente homogêneas, homozigóticas e reproduzíveis para serem úteis como ascendentes de híbridos comerciais. Muitos métodos analíticos estão disponíveis para determinar a homozigosidade e estabilidade fenotípica de linhas consanguíneas.

[085]A expressão "plantas híbridas" refere-se a plantas que resultam de um cruzamento entre indivíduos geneticamente diferentes.

[086]O termo "cruzado" ou "cruzamento" no contexto desta invenção significa a fusão de gametas, por exemplo, através de polinização para produzir descendência (isto é, células, sementes ou plantas) no caso de plantas. O termo abrange cruzamentos sexuais (a polinização de uma planta

por outra) e no caso de plantas, auto-polinização, isto é, quando o pólen e, o óvulo são da mesma planta.

[087]O termo "introgressão" refere-se à transmissão de um alelo desejado de um *lócus* genético de uma base genética à outra. Em um método, os alelos desejados podem ser introgrididos através de um cruzamento sexual entre dois ascendentes, onde pelo menos um dos ascendentes possui o alelo desejado em seu genoma. O alelo desejado pode ser um *lócus* marcador, um QTL, um transgene ou semelhante. Em algumas modalidades da invenção, o alelo desejado é um alelo de um *lócus* marcador favorável aqui divulgado.

i. Seleção Assistida por Marcador

[088]A "Seleção Assistida por Marcador" ou "MAS" refere-se à prática de selecionar fenótipos desejados entre elementos de uma população de cruzamento usando-se marcadores genéticos. O objetivo principal de qualquer programa de reprodução é combinar tantos alelos favoráveis quanto possível em variedades elite de germoplasma que são geneticamente superiores (com relação a um ou mais traços agrônômicos) em relação a seus ancestrais. Os marcadores aqui fornecidos identificam segmentos cromossômicos, isto é, regiões genômicas, e alelos (formas alélicas) da região de QTL6 que estão associados com o traço fenotípico de alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico e/ou alto teor de ácido oléico/baixo teor de ácido linoléico. Conseqüentemente, estes marcadores podem ser usados para seleção de plantas assistida por marcadores, por exemplo, pés de milho, com o traço fenotípico de alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico e/ou alto teor de ácido oléico/baixo teor de ácido linoléico (isto é, relação

aumentada entre o ácido oléico/ácido linoléico). Por exemplo, em um cruzamento entre ascendentes que complementam alelos favoráveis no *loci* alvo, a descendência pode ser selecionada a qual inclui mais alelos favoráveis que qualquer um dos ascendentes.

[089]A seleção assistida por marcador (MAS), empregando os marcadores da presente invenção, e os segmentos cromossômicos que eles identificam, é útil no contexto de um programa de reprodução de milho para aumentar o conteúdo de óleo e/ou conteúdo de ácido oléico e/ou a relação entre o ácido oléico e ácido linoléico de uma planta ou parte desta planta. A seleção fenotípica para um traço de interesse, tal como alto conteúdo de óleo, alto conteúdo de ácido oléico ou relação aumentada entre o ácido oléico/ácido linoléico para grandes números de amostras pode ser cara, assim como consumidora de tempo. Além disso, a seleção fenotípica apenas é muitas vezes não confiável devido aos efeitos de epistasia e contribuições não genéticas (por exemplo, ambientais) ao fenótipo. MAS oferece a vantagem sobre a avaliação de campo porque pode ser executada em qualquer momento do ano sem levar em consideração a estação de crescimento ou estágio de desenvolvimento. Além disso, MAS facilita a avaliação de organismos desenvolvidos em regiões díspares ou sob condições diferentes.

[090]Um criador de habilidade comum, desejando cultivar plantas com conteúdo de óleo aumentado e/ou conteúdo de ácido oléico aumentado e/ou relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico, pode aplicar os métodos para MAS aqui descritos, usando-se, por exemplo, o

lócus marcador favorável exemplar fornecido aqui ou os *loci* marcadores ligados localizados aos segmentos de cromossomo identificados pelos *loci* marcadores favoráveis aqui fornecidos, para originar linhas de planta com conteúdo de óleo aumentos e/ou conteúdo de ácido oléico aumentado e/ou relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico.

[091] Alelos marcadores genéticos, por exemplo, os *loci* marcadores exemplares expostos em Id. de Seq. n^{os}: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 e 47 e alelos destes compreendendo um ou mais dos respectivos polimorfismos identificados nas Tabelas 2 e 3 aqui abaixo, marcadores ligados, e QTL, identificamndo os segmentos de cromossomo que abrangem os elementos genéticos que são importantes para alto conteúdo de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico e/ou relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico, são usados para identificar plantas que contêm um genótipo desejado em um ou mais *loci*, e que se espera que transfiram o genótipo desejado, junto com um fenótipo desejado a sua prole. Os alelos marcadores (ou alelos de QTL) podem ser uados para identificar plantas que contêm um genótipo desejado em um *lócus*, ou em vários *loci* não ligado ou ligado (por exemplo, um haplótipo) e que se espera que transfira o genótipo desejado, junto com um fenótipo desejado a sua prole. Similarmente, identificando-se as plantas que carecem do alelo desejado, as plantas com um fenótipo indesejável, por exemplo, plantas com um teor de óleo não muito alto e/ou fenótipo com teor de ácido oleico não muito alto, ou fenótipo com teor de óleo normal (quando comparado ao amarelo #2), podem ser identificadas, e, por

exemplo, eliminadas de cruzamentos subsequentes. Será avaliado que para os propósitos de MAS, o termo marcador pode abranger tanto os *loci* marcadores quanto os *loci* de QTL, uma vez que ambos podem ser usados para indentificar plantas com um fenótipo desejado.

[092] Por exemplo, MAS pode ser usado para desenvolver linhas ou cepas de milho e germoplasma de milho com alto conteúdo de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico e/ou relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico identificando-se as formas alélicas favoráveis dos segmentos de cromossomo mostrados como sendo importantes, por exemplo, que incluem um elemento genético, para alto conteúdo de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico. Desta maneira, os *loci* marcadores favoráveis aqui divulgados podem ser empregados como previsores para o traço de alto teor de óleo e/ou o traço de alto teor de ácido oléico, e assim ser previsores para o traço fenotípico de alto teor de ácido oléico/baixo teor de ácido linoléico (isto é, relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico). Resumidamente, os pés de milho ou germoplasma podem ser seleccioandos por um ou mais *loci* marcadores favoráveis ou alelos de *loci* marcadores favoráveis que se correlacionam positivamente com o alto teor de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico, e/ou relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico, sem verdadeiramente dar origem ao milho através de seu ciclo de vida e executar avaliações fenotípicas (isto é, medir o alto teor de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico e/ou relação aumentada entre o ácido oléico/ácido linoléico). Conforme discutido acima, a presente invenção fornece meios para identificar plantas,

particularmente pés de milho, que possuem um conteúdo de óleo aumentado e/ou um conteúdo de ácido oléico aumentado e/ou uma relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico através da identificação de plantas que possuem um *lócus* marcador favorável exposto em Id. de Seq. nº: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 ou 51 com pelo menos um polimorfismo neste, por exemplo, o *lócus* marcador favorável divulgado em Id. de Seq. nº: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 ou 47 ou um alelo deste compreendendo um ou mais dos polimorfismos aqui identificados (ver, por exemplo, as Tabelas 2 e 3 aqui abaixo). Similarmente, em outras modalidades, os pés de milho podem ser selecionados contra se eles possuem um ou mais *loci* marcadores que se correlacionam negativamente com alto teor de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico e/ou relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico. Além disso, estes *loci* marcadores podem ser intregredido em qualquer base genômica desejada, germoplasma, linha, variedade etc., como parte do programa de seleção assistido por marcador projetado para aumentar o conteúdo de óleo e/ou o conteúdo de ácido oléico, ou para aumentar a relação entre ácido oléico e ácido linoléico no milho.

[093]Resumidamente, na seleção assitada por marcador, uma amostra de tecido é tomada de um primeiro pé de milho ou de um primiro germoplasma de milhoe é selecionada para determinar se o primeiro pé de milho ou o primeiro germoplasma de milho compreende um *lócus* marcador apropriado ou alelo deste que está correlacionado com alto

conteúdo de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oleico e/ou relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico. Os pés de milho ou germoplasma de milho possuindo o *lócus* marcador desejado são selecionados e cruzados com um segundo pé de milho ou germoplasma.

[094]Em ainda outras modalidades, os *loci* marcadores desejados ou alelos deste são introgrididos em um segundo pé de milho ou um segundo germoplasma de milho pra produzir um pé de milho ou germoplasma de milho introgridido. Em modalidades específicas, o pé de milho introgridido ou germoplasma apresenta um conteúdo de óleo aumentado, um conteúdo de ácido oléico aumentado ou uma relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico quando comparados ao segundo pé de milho ou germoplasma.

[095]Será avaliado que plantas positivas para um ou mais *loci* marcadores favoráveis da invenção podem ser selecionados e cruzados de acordo com qualquer protocolo de reprodução relevante ao programa de reprodução particular. Conseqüentemente, a prole pode ser gerada de uma planta selecionada pelo cruzamento da planta selecionada para uma ou mais plantas selecionadas na base do mesmo marcador ou de um marcador diferente, por exemplo, um marcador diferente correlacionando-se com alto conteúdo de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico e/ou relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico, ou um fenótipo diferente de interesse, por exemplo, resistência a uma doença particular. Alternativamente, uma planta selecionada pode ser retrocruzada com um ou ambos os progenitores. O retrocruzamento é freqüentemente feito para o propósito de introgridir um ou alguns *loci* de um progenitor doador, por

exemplo, um progenitor doador compreendendo germoplasma exótico, em uma outra base genética diferente do progenitor recorrente (tipicamente, uma elite).

[096] Quanto mais ciclo de retrocruzamento são executados, maior a contribuição genética do progenitor recorrente à variedade resultante. Uma planta selecionada pode também ser retrocruzada, por exemplo, a uma planta ou linha não presente em sua genealogia. Tal planta pode ser selecionada entre uma população de interesse para uma rodada de análise prévia, ou pode ser introduzida novamente no programa de cruzamento. Uma planta positiva para um marcador desejado pode também ser auto-cruzada para criar uma linha de cruzamento verdadeira com o mesmo genótipo.

ii. Uso de conteúdo de ácido oléico para monitorar e confirmar a presença de QTL6

[097] Conforme notado nos exemplos aqui abaixo, a concentração de ácido oléico mostra um maior aumento que o conteúdo de óleo dentro de pés de milho que portam a região de QTL6 de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico favorável aqui descrita. Este traço fenotípico pode ser usado para monitorar e confirmar a presença de um *locus* marcador favorável da invenção, e assim prever se um pé de milho ou germoplasma de milho terá o traço desejável de alto conteúdo de óleo e/ou relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico.

[098] Em algumas modalidades, o *locus* marcador favorável a ser detectado está dentro do polinucleotídeo codificando DGTA, por exemplo, dentro do polinucleotídeo codificando DGAT1-2. Desta forma, o *locus* marcador favorável a ser detectado pode compreender um polimorfismo

no polinucleotídeo codificando ZmDGAT1-2 (por exemplo, a sequência codificadora exposta em Id. de Seq. nº:51) onde a mudança polimórfica à sequência codificadora de ZmDGAT1-2 resulta em uma substituição do resíduo de glicina pelo resíduo de serina na posição do aminoácido correspondente ao resíduo 45 de Id. de Seq. nº:52; uma substituição do resíduo de serina pelo resíduo de prolina na posição do aminoácido correspondente ao resíduo 55 de Id. de Seq. nº:52; uma deleção do resíduo de glutamina correspondente àquela posição do aminoácido 64, 65, 66 ou 67 de Id. de Seq. nº:52; e/ou uma inserção de um resíduo de fenilalanina em uma posição localizada entre um par de resíduos, onde o par de resíduos corresponde a um par de resíduos dentro de Id. de Seq. nº:52 selecionado a partir do grupo consistindo de: (a) o resíduo de triptofano na posição 467 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52 e o resíduo de fenilalanina na posição 468 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52, (b) o resíduo de fenilalanina na posição 468 do aminoácido de Id. de Seq. nº: 52 e o resíduo de fenilalanina na posição 469 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52 e (c) o resíduo de fenilalanina na posição 469 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52 e o resíduo de serina na posição 470 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52. Um exemplo não limitante de um *locus* marcador favorável dentro de um polinucleotídeo codificante DGAT1-2 é uma sequência compreendendo a sequência exposta em Id. de Seq. nº:47, que codifica a proteína ZmDGAT1-2(ASK) exposta em Id. de Seq. nº:48.

[099] Assim, a presente invenção fornece um método para detectar a presença de um ou mais *locus* marcador favorável da invenção, e assim identificar a presença da região de

QTL6 aqui descrita, em um pé de milho ou germoplasma de milho, onde o método compreende determinar a concentração de ácido oléico da planta ou germoplasma, particularmente dentro da semente ou embrião. Desta maneira, uma concentração de ácido oléico na semente ou embrião de pelo menos 35% (isto é, 35% ou mais do óleo da semente ou embrião são representados pelo ácido oléico) será preditiva de que o pé de milho ou germoplasma de milho provavelmente compreendem um ou mais *loci* marcadores favoráveis da invenção, e portanto a região de QTL6 desejada aqui definida, e portanto será beneficemente continuada no processo de reprodução e seleção. Alternativamente, uma concentração de ácido oléico na semente ou embrião de menos de 35% (isto é, o ácido oléico representa menos de 35% do óleo da semente ou embrião) será preditiva de que o pé de milho ou germoplasma de milho não portam a região de QTL6 desejada em seu genoma.

[100] Esta etapa de seleção de ácido oléico pode ser também suplementada com seleções genômicas para a presença de um ou mais *loci* marcadores favoráveis da região de QTL6 descrita aqui, e portanto a presença da região de QTL6 desejada. Em um tal exemplo, a presença da região de QTL6 desejada é confirmada pela detecção da presença da inserção do códon TTC dentro da sequência codificadora de ZmDGAT 1-2 que resulta na inserção de Phe467, Phe468 ou Phe469 na proteína ZmDGAT 1-2 (ASK). Isto pode ser alcançado, por exemplo, pela amplificação de um fragmento de DNA em torno de um códon usando Id. de Seq. nº: 126 e 127, conforme descrito nos Exemplos 3 e 13 aqui abaixo.

(C) Polinucleotídeos e/ou Polipeptídeos Associados com

QTL6

[101]A presente invenção fornece plantas ou partes de planta que têm estavelmente incorporado em seu genoma um polinucleotídeo heterólogo compreendendo pelo menos uma sequência associada ao alto conteúdo de óleo e/ou pelo menos uma sequência associada ao alto conteúdo de ácido oléico operativamente ligada a um promotor ativo na planta ou parte desta planta, onde a referida sequência associada ao alto conteúdo de óleo ou a referida sequência associada ao alto conteúdo de ácido oléico é derivada de uma sequência de nucleotídeo genômico geneticamente ligada a pelo menos um alelo de um ou mais *loci* marcadores favoráveis que estão associados com o alto conteúdo de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico, e/ou relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico de uma planta ou parte desta planta. Em algumas modalidades, os *loci* marcadores favoráveis são geneticamente ligados com uma região de QTL6 que é flanqueada por uma primeira sequência de borda que compreende os nucleotídeos de 1-20 de Id. de Seq. nº:2, e uma segunda sequência de borda que compreende os nucleotídeos 477-496 de Id. de Seq. nº:46. Em outras modalidades, os *loci* marcadores favoráveis são geneticamente ligados com uma região também definida desta região de QTL6, onde a região também definida é flanqueada por uma primeira sequência de borda que compreende os nucleotídeos de 1-20 de Id. de Seq. nº:6, e uma segunda sequência de borda que compreende os nucleotídeos de 482-501 de Id. de Seq. nº: 14. Em ainda outras modalidades, os *loci* marcadores favoráveis são geneticamente ligados com uma segunda também definida região desta região de QTL6,

onde a segunda região também definida é flanqueada por uma primeira sequência de borda que compreende os nucleotídeos de 1-20 de Id. de Seq. n°: 10, e uma segunda sequência de borda que compreende os nucleotídeos de 488-507 de Id. de Seq. n°:4. Esta segunda região também definida, que reside em um gene único, DGAT1-2, controla tanto as concentrações de óleo quanto de ácido oléico no embrião. É reconhecido que os *loci* marcadores favoráveis da invenção podem compreender sequências que não são codificadoras, por exemplo, RNA não codificador que funciona sem ser traduzido em uma proteína, também referido como pequeno RNA (sRNA), incluindo microRNAs (miRNAs) e pode compreender sequência codificadora, por exemplo, um quadro de leitura aberto, conforme notado aqui acima.

[102]Em algumas modalidades, os *loci* marcadores compreendem uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo das sequências expostas em Id. de Seq. n°:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 e 51 com pelo menos um polimorfismo neste que confere ou está associado com o alto conteúdo de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico e/ou relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico de uma planta ou parte desta planta. Exemplos não limitantes destes polimorfismosn estão divulgados na Tabela 2 e 6 aqui abaixo. Em algumas destas modalidades, os *loci* marcadores favoráveis incluem o *locus* marcador exposto em Id. de Seq. n°:4 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo em uma posição de nucleotídeo (nt) dentro de Id. de Seq. n°:4 selecionada a partir do grupo consistindo de nt 28, 204, 256, 302, 305, 341, 429, 461, e qualquer combinação destes;

o *locus* marcador exposto em Id. de Seq. nº:6 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo em uma posição nt dentro de Id. de Seq. nº:6 selecionado a partir do grupo consistindo de nt 43, 74, 208, 224 e qualquer combinação destes; o *locus* marcador exposto em Id. de Seq. nº:8 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo a uma posição nt dentro de Id. de Seq. nº: 8 selecionada a partir do grupo consistindo de 25, 55, 88, 100, 195, 223, 238, 242, 255, 279, 306, 307, 345, 399, e qualquer combinação destes; o *locus* marcador exposto em Id. de Seq. nº: 10 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo a uma posição nt dentro de Id. de Seq. nº:10 selecionada selecionada de nt 40, 41, 88, 89, 126, 134, 146, 218 e qualquer combinação destes; o *locus* marcador exposto em Id. de Seq. nº: 12 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo em uma posição nt dentro de Id. de Seq. nº: 12 selecionada a partir de nt 128, 195, 256, 257, 293, 294, 295, 296, 327, qualquer combinação destes; o *locus* marcador exposto em Id. de Seq. nº: 14 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo em uma posição nt dentro de Id. de Seq. nº: 14 selecionada a partir de nt 262, 311, e qualquer combinação destes; o *locus* marcador exposto em Id. de Seq. nº: 16 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo em uma posição nt 428 de Id. de Seq. nº: 16; o *locus* marcador exposto em Id. de Seq. nºs: 18 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo em uma posição nt dentro de Id. de Seq. nº: 18 selecionada a partir de nt 119, 396, 420, e qualquer combinação destes; o *locus* marcador exposto em Id. de Seq. nº: 20 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo em uma posição nt dentro de Id. de Seq. nº:20 selecionado a partir de nt 194, 258, 259, 260, 365, 366, 489, e qualquer

combinação destes; o *locus* marcador exposto em Id. de Seq. nº:22 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo em uma posição nt dentro de Id. de Seq. nº:22 selecionada a partir de nt 48, 50, 56, 60, 63, 101, 133, 166, 170, 179, 181, 206, 207, 211, 231, 237, 255, 273, 282, 294, 312, 324, 343, 345, 358, 377, 381, 385, 387, 404, e qualquer combinação destes; o *locus* marcador exposto em Id. de Seq. nº:24 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo em uma posição nt dentro de Id. de Seq. nº:24 selecionada a partir de nt 358, 359, 371, 421, 422, 423, 425, 426, e qualquer combinação destes; o *locus* marcador exposto em Id. de Seq. nº:26 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo em uma posição nt em Id. de Seq. nº:26 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo em uma posição nt em Id. de Seq. nº:26 selecionada a partir de nt 28, 31, 35, 43, 50, 111, 117, 143, 192, 197, 219, 266 e qualquer combinação destes; o *locus* marcador exposto em Id. de Seq. nº:28 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo em uma posição nt dentro de Id. de Seq. nº:28 selecionada a partir de nt 41, 62, 92, 158, 182, 194, 200, 226, 229, 349 e qualquer combinação destes; o *locus* marcador exposto em Id. de Seq. nº:30 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo em uma posição nt dentro de Id. de Seq. nº:30 selecionada a partir de nt 102, 145, 162, 165, 198, 199, 221, 247, 251, 253, 306, 331, 352, 451, 461, 464, e qualquer combinação destes; o *locus* marcador exposto em Id. de Seq. nº:32 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo em uma posição nt dentro de Id. de Seq. nº:32 selecionada de nt 61, 73, 87, 143, 199, 208, 209, 210, 211, 225, 327, 328, 335 e qualquer combinação destes; e o *locus* marcador exposto em Id. de Seq. nº:51 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo em uma

posição nt dentro de Id. de Seq. nº:51 selecionada a partir de nt 134; nt 163; nt 190-192 ou 193-195 ou 196-198 ou 199-201; nt 1401 ou 1404 ou 1407; e qualquer combinação destes. Mudanças polimórficas exemplares dentro destes *loci* marcadores estão expostas nas Tabelas 2 e 3 aqui abaixo. Em algumas modalidades, o *locus* marcador favorável compreende a seqüência divulgada em Id. de Seq. nº: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 ou 47, ou um alelo deste compreendendo um ou mais dos polimorfismos identificados nesta (ver, por exemplo, Tabela 2 e Tabela 3, aqui abaixo).

[103]É reconhecido que as plantas transformadas de maneira estável podem compreender qualquer um ou todos os polinucleotídeos para os *loci* marcadores favoráveis aqui identificados. Em tais modalidades, a expressão do polinucleotídeo heterólogo compreendendo a seqüência associada com alto teor de óleo ou alto teor de ácido oléico aumenta o conteúdo de óleo ou o conteúdo de ácido oléico na planta ou parte desta planta, e pode aumentar de forma favorável a relação entre o ácido oléico e ácido linoléico na planta ou parte desta planta.

(i) Quadros de Leitura Abertos do *locus* QTL6

[104]QTL6 foi finamente mapeado a uma região de aproximadamente 195 kb que foi caracterizada e encontrada para conter cinco quadros de leitura abertos. Sem estar preso pela teoria, uma ou mais proteínas coificadas por estes quadros de leitura abertos estão associadas com um fenótipo de alto teor de óleo, e/ou um fenótipo de alto teor de ácido oléico, e/ou um fenótipo de alto teor de óleo/baixo teor de ácido linoleico (isto é, relação

aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico). Assim, o conteúdo de óleo e/ou o conteúdo de ácido oléico e/ou a relação entre o ácido oléico e ácido linoléico de uma planta ou parte desta planta podem ser manipulados por superexpressão de uma ou mais destas proteínas na planta ou parte desta planta.

(a) Diacilglicerol o-aciltransferase tipo 1 (DGAT)

[105]A presente invenção fornece uma nova variante de uma diacilglicerol o-aciltransferase tipo 1 (DGAT) que, sob expressão em uma planta ou parte desta planta, aumenta o conteúdo de óleo, aumenta o conteúdo de ácido oléico, e/ou aumenta a relação entre o ácido oléico e ácido linoléico na planta ou parte desta planta, quando comparada à sequência de DGAT tipo 1 de uma planta que não exhibe fenótipo de alto teor de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico e/ou alto teor de ácido oleico/baixo teor de ácido linoléico, por exemplo, a sequência de DGAT 1-2 de milho de teor normal de óleo exposta em Id. de Seq. nº:52 (designada ZmDGAT1-2(EF09B)). Uma sequência de DGAT variante que aumenta o conteúdo de óleo, aumenta o conteúdo de ácido oléico e/ou aumenta a relação entre o ácido oléico e ácido linoléico em uma planta ou parte desta planta desta forma é referida aqui como "uma variante de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico" de DGAT, e a sequência condificadora para esta variante representa a sequência associada a alto teor de óleo e alto teor de ácido oléico da invenção. O termo "variante" refere-se a uma proteína que compreende uma sequência de aminoácido que se difere da sequência de aminoácido para a proteína de referência pelas deleções de

aminoácido, substituições de aminoácido ou ambos.

[106]A variante de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico de DGAT da presente invenção designada ZmDGAT1-2(ASK) compreende uma sequência de aminoácido que se difere da sequência de DGAT 1-2 de milho com teor normal de óleo de referência tendo uma substituição do resíduo de glicina pelo resíduo de valina na posição do aminoácido correspondente ao resíduo 45 de Id. de Seq. n°:52; uma substituição do resíduo de serina pelo resíduo de prolina na posição do aminoácido correspondente ao resíduo 55 de Id. de Seq. n°: 52; uma deleção do resíduo de glutamina correspondendo àquela posição no aminoácido 64, 65, 66 ou 67 de Id. de Seq. n°:52; e/ou uma inserção de um resíduo de fenilalanina em uma posição localizada entre um par de resíduos, onde o par de resíduos corresponde a um par de resíduos dentro de Id. de Seq. n°:52 selecionado a partir do grupo consistindo de: (a) o resíduo de triptofano na posição 467 do aminoácido de Id. de Seq. n°:52 e o resíduo de fenilalanina na posição 468 do aminoácido de Id. de Seq. n°:52, (b) o resíduo de fenilalanina na posição 468 do aminoácido de Id. de Seq. n°: 52 e o resíduo de fenilalanina na posição 469 do aminoácido de Id. de Seq. n°:52, (c) o resíduo de fenilalanina na posição 469 do aminoácido de Id. de Seq. n°:52 e o resíduo de serina na posição 470 do aminoácido de Id. de Seq. n°:52. Veja a sequência de polipeptídeo ZmDGAT1-2(ASK) exposta em Id. de Seq. n°:48. Veja também o alinhamento do polipeptídeo ZmDGAT1-2(ASK) com a sequência de polipeptídeo ZmDGAT1-2 a partir de três linhas consanguíneas com teor normal de óleo, EF09B, Mo 17 e B73, mostradas na Figura 30. Um

alinhamento das respectivas seqüências codificadoras é mostrado na Figura 31. A variante de DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico da invenção pode ter uma ou mais destas várias modificações. Conforme aqui usado, a seqüência de aminoácido de referência para DGAT 1-2 de milho a partir de linhas consanguíneas com teor normal de óleo é mostrada em Id. de Seq. nº:52 (seqüência para ZmDGAT1-2(EF09B)), que é codificada por uma seqüência de nucleotídeo tal como aquela exposta em Id. de Seq. nº:51.

[107] Uma ou mais das substituições particulares aqui divulgadas resulta em uma variante de DGAT que retém as atividades desejadas de considerar um aumento nos níveis de óleo e/ou ácido oléico e/ou um aumento na relação entre o ácido oléico e ácido linoléico de uma planta ou parte desta, quando comparada a uma planta ou parte desta planta de controle apropriada, conforme descrito em algum lugar aqui. Tendo-se identificado as posições dentro da seqüência de DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico (isto é, a seqüência ZmDGAT1-2(ASK)) e as substituições, deleções e inserções relevantes, faz parte das habilidades de qualquer um habilitado na técnica variar outros resíduos dentro da seqüência variante de DGAT para se obter variantes de DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico aqui divulgada que também retêm a atividade desejada, isto é, aumentando o conteúdo de óleo e/ou aumentando o conteúdo de ácido oléico, e/ou aumentando a relação entre o ácido oléico e ácido linoléico de uma planta ou parte desta planta. Tais variantes da variante de DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico divulgadas aqui são também objetivadas para serem

abrangidas pela presente invenção, e são também definidas abaixo. A presente invenção também fornece quaisquer seqüências de nucleotídeo codificando as variantes de DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico da invenção, por exemplo, a seqüência codificadora exposta em Id. de Seq. nº:47, que codifica a variante de DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico ZmDGAT1-2(ASK) (Id. de Seq. nº:48).

[108] Diacylglycerol acyltransferase (DGAT, EC 2.3.1.20) usa acil-CoA graxo e diacylglycerol como substratos para catalisar a etapa comprometida na síntese de triacylglycerol. DGATs executam um papel fundamental no metabolismo de glicerolípídeos celulares. Muitos elementos da família de DGAT foram identificados em plantas, varios dos quais são mostrados em um alinhamento na Figura 33. A DGTA de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico da presente invenção (ZmDGAT1-2(ASK)) está também mostrada na Figura 33. Análise filogenética (ver Figura 32) destes polipeptídeos de DGAT foi executada usando-se o programa PHYLIP (J. Felsenstein, University of Washington) e foi apresentada usando-se o programa TreeView (Página (1996) *Computer Appl. Biosci.* 12:357-358). A diacylglycerol acyltransferases tipo I e tipo II de planta, glicerol-3-fosfato acyltransferases (GPAT) e lisofosfatidil acyltransferases (LPAT) foram inclusas na análise. Os resultados mostram que a DGAT tipo 1 (DGAT1) é distinta da DGAT tipo 2 (DGAT2), GPAT e LPAT. Dentro da DGTA tipo 1, um subgrupo DGAT 1-2 composto de várias espécies de monocotilédone pode ser também diferenciado. O ORF de DGAT localizado na região de QTL6 da invenção é um elemento do

subgrupo DGAT 1-2.

[109] São também fornecidos aqui o polipeptídeo ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo conforme identificado nas linhas consanguíneas de milho com teor normal de óleo EF09B, Mo 17 e B73. Para os propósitos da presente invenção, este polipeptídeo é referido aqui como ZmDGAT1-2 or ZmDAGT1-2(EF09B), ZmDGAT1-2(Mo17) ou ZmDGAT1-2(B73) com "teor normal de óleo", dependendo da linha consanguínea de milho com teor de óleo normal a partir da qual o polipeptídeo ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo foi derivado. O polipeptídeo ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo está exposto em Id. de Seq. n°:50 (referido aqui referido como ZmDGAT1-2(Mo17), Id. de Seq. n°:52 (referido aqui como ZmDGAT1-2(EF09B) e Id. de Seq. n°:54 (referido aqui como ZmDGAT1-2(B73)). Os polinucleotídeos codificando o polipeptídeo ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo são também abrangidos pela presente invenção. Os polinucleotídeos exemplares são expostos em Id. de Seq. n°:49 (aqui referido como seqüência codificadora de ZmDGAT 1-2(Mo 17), Id. de Seq. n°:51 (aqui referido como seqüência codificadora de ZmDGAT 1-2(EF09B) e Id. de Seq. n°:53 (aqui referido como seqüência codificadora de ZmDGAT1-2(B73)). Conforme notado acima, para propósitos de comparação das mudanças polimórficas entre as seqüências codificadoras de ZmDGAT 1-2(ASK) de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico e seqüências de polipeptídeo e as respectivas seqüências codificadoras de ZmDGAT 1-2 com teor normal de óleo e as seqüências de polipeptídeo, ZmDGAT 1-2(EF09B) serve como a ZmDGAT 1-2 com teor normal de óleo de referida^rencia (isto é, a seqüência de aminoácido exposta em Id. de Seq. n°:52 e

a sequência codificadora exemplar exposta em Id. de Seq. nº:51). Variantes do polipeptídeo ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo e polinucleotídeos codificando estes variantes são também abrangidos pela presente invenção.

[110]O polipeptídeo ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo e as sequências que codificam esta proteína e variantes destes que retêm a atividade da proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo, e portanto estão envolvidas na biosíntese de óleo, também encontram uso no aumento do conteúdo de óleo e/ou conteúdo de ácido oléico e/ou relação crescente entre o ácido oléico e ácido linoléico de acordo com os métodos da presente invenção. Desta forma, a superexpressão do polipeptídeo ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo, ou os fragmentos funcionais e variantes destes conforme definido em algum lugar aqui, podem fornecer conteúdo de óleo aumentado, conteúdo de ácido oléico aumentado e/ou relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico em uma planta ou parte desta planta, conforme descrito aqui abaixo. Ver também Exemplo 11 abaixo.

(b) Permease de Aminoácido

[111]A presente invenção também fornece o quadro de leitura aberto para o polipeptídeo permease 1 de aminoácido de milho (AAP1) (Id. de Seq. nº:56, designado ZmAAP1) e variantes biologicamente ativas desta conforme aqui definido abaixo. Os polinucleotídeos isolados codificando o polipeptídeo ZmAAP1 são também abrangidos pela presente invenção. Em tal modalidade, o polinucleotídeo isolado compreende a sequência exposta em Id. de Seq. nº:55 ou variante desta codificando um polipeptídeo AAP1

biologicamente ativo. A Figura 34 mostra um alinhamento do polipeptídeo ZmAAP1 com outros polipeptídeos AAP relacionados a partir de outras espécies de planta. Para uma revisão das permeases de aminoácido no transporte de aminoácidos, em geral, veja, por exemplo, Wipf e outros, (2002) *Trends Biochem. Sci.* 27(3): 139-147. 139-147.

(c) Proteína de Sistema de Efluxo de K⁺ (PESP)

[112]A presente invenção também fornece o quadro de leitura aberto para a proteína de sistema de efluxo de potássio de milho (Id. de Seq. n°:58, designado ZmPESP) e variantes biologicamente ativas desta conforme aqui definido abaixo. Os polinucleotídeos isolados codificando o polipeptídeo ZmPESP são também abrangidos pela presente invenção. Em tal modalidade, o polinucleotídeo isolado compreende a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:57 ou variante desta codificando um polipeptídeo PESP biologicamente ativo. A Figura 35 mostra um alinhamento do polipeptídeo ZmPESP com outros polipeptídeos PESP relacionados a partir de outras espécies de planta. Para uma revisão dos polipeptídeos PESP, em geral, veja, por exemplo, Ferguson e outros, (1993) *Mol. Microbiol.* 9(6): 1297-1303.

(d) Proteína S24 Ribossômica 40S

[113]A presente invenção também fornece o quadro de leitura aberto para a proteína S24 ribossômica 40S (Id. de Seq. n°:60, designado ZmS24) e variantes biologicamente ativas desta conforme aqui definido abaixo. Os polinucleotídeos isolados codificando o polipeptídeo ZmS24 são também abrangidos pela presente invenção. Em tal modalidade, o polinucleotídeo isolado compreende a

seqüência exposta em Id. de Seq. n°:59 ou variante desta codificando uma proteína S24 ribossômica 40S biologicamente ativa. A Figura 36 mostra um alinhamento do polipeptídeo ZmS24 com outras proteínas ribossômicas relacionadas a partir de outras espécies de planta. Para uma revisão dos polipeptídeos S24 ribossômicos, em geral, veja, por exemplo, Xu e Roufa (1996) *Gene* 169:257-262.

(e) Transportador ABC

[114]A presente invenção também fornece o quadro de leitura aberto para o polipeptídeo do transportador ABC tipp PDR de milho (ABCT) (seqüência compósita mostrada em Id. de Seq. n°:64, designado ZmABCT(compósito) aqui) e variantes biologicamente ativas desta conforme aqui definido abaixo. Os polinucleotídeos isolados codificando o polipeptídeo ZmABCT(compósito) são também abrangidos pela presente invenção. Em tal modalidade, o polinucleotídeo isolado compreende a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:63 ou variante desta codificando um polipeptídeo do ABCT biologicamente ativo.

[115]A seqüência codificadora de comprimento total foi construída a partir de uma seqüência de cDNA de ORF parcial de ZmABCT clonada a partir da linha de milho consanguínea Mo 17 sem alto teor de óleo, sem alto teor de ácido oléico (seqüência exposta em Id. de Seq. n°:61), codificado a seqüência de aminoácido de terminal N exposta em Id. de Seq. n°:62) e EST e a seqüência genômica para linha de milho consanguíneas B73 sem alto teor de óleo, sem alto teor de ácido oléico. A Figura 37 mostra um alinhamento do polipeptídeo ZmABCT(compósito) com outros polipeptídeos ABCT relacionados a partir de outras espécies de planta.

Para uma revisão dos polipeptídeos ABCT, em geral, veja, por exemplo, Van den Brule e Smart (2002) *Planta* 216:95-106.

(C) Variantes e Fragmentos

[116]A invenção abrange composições de polinucleotídeo ou de proteína substancialmente purificados ou isolados. Um polinucleotídeo ou proteína "isolada" ou "purificada" ou porção biologicamente ativa destes, está substancialmente ou essencialmente livre de componentes que normalmente acompanham ou interagem com polinucleotídeo ou proteína conforme encontrados em seu ambiente ocorrendo naturalmente. Assim, um polinucleotídeo ou proteína isolada ou purificada é substancialmente livre de outro material celular, ou meio de cultura quando produzido por técnicas recombinantes, ou substancialmente livre de precursores químicos ou outros produtos químicos quando sintetizados quimicamente. De forma ideal, um polinucleotídeo "isolado" é livre de seqüências (preferivelmente, seqüências que codificam proteína) que flanqueiam naturalmente o polinucleotídeo (isto é, seqüências localizadas nas extremidades 5' e 3' do polinucleotídeo) no DNA genômico do organismo a partir do qual o polinucleotídeo é derivado. Por exemplo, em várias modalidades, o polinucleotídeo isolado pode conter menos de cerca de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb ou 0,1 kb de seqüências de nucleotídeo que flanqueiam naturalmente o polinucleotídeo no DNA genômico da célula a partir da qual o polinucleotídeo é derivado. Uma proteína que é substancialmente livre de material celular inclui preparações de proteína possuindo menos de cerca de 30%, 20%, 10%, 5% ou 1% (em peso seco) de proteína

contaminante. Quando a proteína da invenção ou porção biologicamente ativa desta é produzida de forma recombinante, preferivelmente o meio de cultura representa menos de cerca de 30%, 20%, 10%, 5% ou 1% (em peso seco) dos precursores químicos ou produtos químicos não-proteicos de interesse.

[117] Os fragmentos e variantes dos polinucleotídeos divulgados e quaisquer proteínas codificadas por estes são também abrangidos pela presente invenção. Por "fragmento" pretende-se dizer uma parte do polinucleotídeo, por exemplo, uma parte do polinucleotídeo para o *lócus* marcador compreende a sequência exposta em Id. de Seq. n°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, ou, no caso de uma proteína da invenção, uma parte da sequência de man e por conseguinte a proteína codificada por este.

[118] Onde o polinucleotídeo da invenção compreende um quadro de leitura aberto, por exemplo, um polinucleotídeo codificando os polipeptídeos ZmDGAT1-2(ASK) com alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo, ZmAAP1, ZmPESP, ZmS24 ou ZmABCT(compósito), tal como, por exemplo, o polinucleotídeo exposto em Id. de Seq. n°:47, 51, 55, 57, 59 ou 63, respectivamente, um fragmento do polinucleotídeo pode codificar os fragmentos de proteína que retêm a atividade biológica do polipeptídeo de comprimento total, e por conseguinte aumentar o conteúdo de óleo e/ou aumentar o conteúdo de ácido oléico e/ou aumentar a relação entre o ácido oléico e ácido linoléico em uma planta ou parte desta planta quando comparada a uma planta de controle apropriada ou parte desta planta.

Alternativamente, fragmentos de um polinucleotídeo que compreendem uma sequência codificadora e que são úteis como marcadores de hibridização geralmente não codificam proteínas de fragmentos que retêm a atividade biológica. Assim, os fragmentos de uma sequência de nucleotídeo podem variar de pelo menos cerca de 10 nucleotídeos, cerca de 20 nucleotídeos, cerca de 50 nucleotídeos, cerca de 100 nucleotídeos e até o polinucleotídeo de tamanho completo aqui divulgado, dependendo do uso objetivado do polinucleotídeo.

[119] Assim, por exemplo, onde o polinucleotídeo representa uma sequência não codificadora, por exemplo, um *locus* marcador compreendendo uma sequência exposta em Id. de Seq. n°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 ou 45, um fragmento do polinucleotídeo pode compreender pelo menos 12, 16, 20, 50, 75, 100, 150, 200 ou 250 nucleotídeos contínuos, ou até o número de nucleotídeos presente em uma sequência de nucleotídeo de comprimento total para um *locus* marcador favorável aqui divulgado (por exemplo, 523, 507, 257, 511, 241, 371, 510, 592, 550, 520, 464, 514, 505, 410, 522, 507, 553, 972, 469, 413, 457, 762 ou 499 nucleotídeos para Id. de Seq. n°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 ou 45, respectivamente). Fragmentos de um *locus* marcador favorável possuindo uma sequência que não é uma sequência codificadora irão compreender pelo menos um dos polimorfismos aqui identificados. Assim, por exemplo, um fragmento de um *locus* marcador compreendendo a sequência exposta em Id. de Seq. n°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29,

31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 ou 45 compreende uma parte da sequência de nucleotídeo que compreende pelo menos um dos polimorfismos identificados nesta; veja, por exemplo, Tabela 2 abaixo e os alinhamentos fornecidos nas Figuras 7-29 aqui.

[120]Um fragmento de um polinucleotídeo que codifica uma porção biologicamente ativa de uma DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico (por exemplo, ZmDGAT1-2(ASK)), uma DGAT com teor de óleo normal (por exemplo, ZmDGAT1-2(EF09B)), uma permease de aminoácido, uma PESP, uma proteína ribossômica ou uma proteína transportadora ABC da invenção irá codificar pelo menos 15, 25, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 650, 700 aminoácidos contínuos, ou até o número total de aminoácidos presentes em uma DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico de comprimento total, uma DGAT com teor de óleo normal, uma permease de aminoácido, uma PESP, uma proteína ribossômica ou uma proteína transportadora ABC da invenção. Os fragmentos de um polinucleotídeo que são úteis como marcadores de hibridização ou iniciadores de PCR geralmente não necessitam codificar uma porção biologicamente ativa de uma DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, uma DGAT com teor de óleo normal, uma permease de aminoácido, uma PESP, uma proteína ribossômica ou uma proteína transportadora ABC.

[121]Assim, um fragmento de um polinucleotídeo da invenção pode codificar uma porção biologicamente ativa de uma DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, uma DGAT com teor de óleo normal, uma permease de aminoácido, uma PESP, uma proteína ribossômica ou uma

proteína transportadora ABC, ou ele pode ser um fragmento que pode ser usado como um marcador de hibridização ou iniciador de PCR usando-se métodos divulgados abaixo. Uma porção biologicamente ativa de uma DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, uma DGAT com teor de óleo normal, uma permease de aminoácido, uma PESP, uma proteína ribossômica ou uma proteína transportadora ABC pode ser preparada isolando-se uma parte de um dos respectivos polinucleotídeos codificando estas proteínas, expressando a porção codificada da DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, DGAT com teor de óleo normal, a permease de aminoácido, a PESP, a proteína ribossômica ou a proteína transportadora ABC (por exemplo, pela expressão recombinante *in vitro*), e analisando-se a atividade da porção codificada da respectiva proteína. Os polinucleotídeos que são fragmentos de uma seqüência de nucleotídeo codificando uma DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, uma DGAT com teor de óleo normal, uma permease de aminoácido, uma PESP, uma proteína ribossômica ou uma proteína transportadora ABC compreende pelo menos 16, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ou 400 nucleotídeos contínuos, ou até o número de nucleotídeos presentes em uma seqüência de nucleotídeo de comprimento total codificando uma DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, uma DGAT com teor de óleo normal, uma permease de aminoácido, uma PESP, uma proteína ribossômica ou uma proteína transportadora ABC aqui divulgadas (por exemplo, 1485, 1485, 1389, 1896, 414 e 4710 nucleotídeos para Id. de Seq. n°:47, 51, 55, 57, 59 e 63 respectivamente).

[122]Em algumas modalidades, o polinucleotídeo codifica um fragmento do polipeptídeo ZmDGAT1-2 (ASK) exposto em Id. de Seq. nº:48, onde o fragmento compreende pelo menos um entre o resíduo de glicina na posição 45 do aminoácido de Id. de Seq. nº:48, o resíduo de serina na posição 55 do aminoácido de Id. de Seq. nº:48, e o resíduo de fenilalanina na posição 467, 468 ou 469 do aminoácido de Id. de Seq. nº:48, onde a expressão do fragmento de polipeptídeo codificado em uma planta ou parte desta planta aumenta o conteúdo de óleo, aumenta o conteúdo de ácido oléico, e/ou aumenta a relação entre o ácido oléico e ácido linoléico na planta ou parte desta planta.

[123]Em outras modalidades, o polinucleotídeo codifica um fragmento do polipeptídeo ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo exposto em Id. de Seq. nº:52 com pelo menos uma alteração selecionada a partir do grupo consistindo de: (a) uma substituição de um resíduo de glicina pelo resíduo de valina na posição 45 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52; (b) um resíduo de serina pelo resíduo de prolina na posição 55 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52; (c) uma deleção do resíduo de glutamina correspondente à posição 64, 65, 66 ou 67 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52; e (d) uma inserção de um resíduo de fenilalanina em uma posição localizada entre um par de resíduos, onde o par de resíduos corresponde a um par de resíduos dentro de Id. de Seq. nº:52 selecionado a partir do grupo consistindo de: (i) o resíduo de triptofano na posição 467 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52 e o resíduo de fenilalanina na posição 468 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52, (ii) o resíduo de fenilalanina na posição 468 do aminoácido de Id. de Seq.

nº: 52 e o resíduo de fenilalanina na posição 469 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52, e (iii) o resíduo de fenilalanina na posição 469 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52 e o resíduo de serina na posição 470 do aminoácido de Id. de Seq. nº:52; onde a expressão do fragmento de polipeptídeo codificado em uma planta ou parte desta planta aumenta o conteúdo de óleo, aumenta o conteúdo de ácido oléico e/ou aumenta a relação entre o ácido oléico e ácido linoléico na planta ou parte desta planta.

[124]Em ainda outras modalidades, o fragmento de um polinucleotídeo codifica um fragmento do polipeptídeo ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo exposto em Id. de Seq. nº: 52 (expondo ZmDGAT1-2(EF09B), que possui a mesma sequência dos polipeptídeos ZmDGAT1-2(Mol7) e ZmDGAT1-2(B73), respectivamente, expostos em Id. de Seq. nº:50 e 54), onde a superexpressão do fragmento de polipeptídeo codificado em uma planta ou parte desta planta aumenta o conteúdo de ácido oléico e/ou aumenta a relação entre o ácido oléico e ácido linoléico na planta ou parte desta planta.

[125]O termo "variantes" objetiva significar substancialmente seqüências similares. Para os polinucleotídeos, uma variante compreende uma deleção e/ou adição de um ou mais nucleotídeos em um ou mais sítios interno dentro do polinucleotídeo nativo e/ou uma substituição de um ou mais nucleotídeos em um ou mais sítios no polinucleotídeo nativo. Conforme aqui usado, um polinucleotídeo ou polipeptídeo "nativo" compreende uma seqüência de nucleotídeo ou uma seqüência de aminoácido que ocorrem naturalmente, respectivamente.

[126]Onde o polinucleotídeo representa uma seqüência não codificadora, por exemplo, um *locus* marcador compreendendo a seqüência exposta em Id. de Seq. nº: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 ou 45, uma variante do *locus* marcador favorável irá compreender uma seqüência de nucleotídeo compreendendo pelo menos um dos polimorfismos identificados na seqüência para o respectivo *locus* marcador (veja, por exemplo, a Tabela 2 e os alinhamentos apresentados nas Figuras 7-29 aqui) e irá reter a caracterísitca de estar associada ao traço fenotípico de alto conteúdo de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico e/ou alto conteúdo de ácido oléico/baixo conteúdo de ácido linoléico (isto é, relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico). Para os polinucleotídeos que codificam uma proteína da invenção, variantes conservativas incluem aquelas seqüências que, por causa da degeneração do código genético, codificam a seqüência de aminoácido da DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, DGAT com teor de óleo normal, permease de aminoácido, PESP, proteína ribossômica ou proteína transportadora ABC da invenção. Os variantes alélicos que ocorrem naturalmente tais como estes podem ser identificados com o uso de técnicas de biologia molecular bem conhecidas, como, por exemplo, com reação de cadeia de polimerase (PCR) e técnicas de hibridização conforme descrito abaixo. Os polinucleotídeos variantes também incluem polinucleotídeos derivados sinteticamente, tais como aqueles gerado, por exemplo, pelo uso de mutagênese sítio-dirigida, e, para seqüências codificadoras, ainda codificam a seqüência de aminoácido da DGAT de alto teor de

óleo/alto teor de ácido oléico, DGAT com teor de óleo normal, permease de aminoácido, PESP, proteína ribossômica ou proteína transportadora ABC da invenção. Geralmente, as variantes de um polinucleotídeo particular da invenção possuirão pelo menos cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de seqüência em relação àquele polinucleotídeo particular conforme determinado pelos programas de alinhamento de seqüência e parâmetros descritos em algum lugar aqui.

[127]As variantes de um polinucleotídeo particular da invenção (isto é, o polinucleotídeo de referência) que codifica um polipeptídeo da invenção podem também ser avaliadas por comparação do percentual de identidade de seqüência entre o polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo variante e o polipeptídeo codificado pelo polinucleotídeo de referência. Assim, por exemplo, um polinucleotídeo isolado que codifica um polipeptídeo com um dado percentual de identidade de seqüência em relação ao polipeptídeo de Id. de Seq. n°:48, 52, 56, 58, 60 e 64 são divulgados. O percentual de identidade de seqüência entre qualquer um dos dois polipeptídeos pode ser calculado usando-se programas de alinhamento de seqüência e os parâmetros descritos aqui em algum lugar. Onde qualquer dado par de polinucleotídeo da invenção é avaliado por comparação do percentual de identidade de seqüência compartilhado pelos dois polipeptídeos que eles codificam, o percentual de identidade de seqüência entre os dois polipeptídeos codificados é pelo menos de cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência.

[128]O termo proteína "variante" é objetivado para significar uma proteína derivada da proteína nativa pela deleção ou adição de um ou mais aminoácidos em um ou mais sítios internos na proteína nativa e/ou substituição de um ou mais aminoácidos em um ou mais sítios na proteína nativa. As proteínas variantes abrangidas pela presente invenção são biologicamente ativas, isto quer dizer que elas continuam a possuir a atividade biológica desejada da proteína que ocorre naturalmente, isto é, a atividade biológica desejada da proteína ZmDGAT1-2(ASK), proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo (por exemplo, ZmDGAT1-2(EF09B)), a proteína ZmAAP1, a proteína ZmPESP, a proteína ZmS24 e a proteína ZmABCT conforme aqui descrito. Tais variantes podem resultar de, por exemplo, um ou mais polimorfismos genéticos ou de manipulação humana. As variantes biologicamente ativas de uma DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico que ocorre naturalmente da invenção, tal como ZmDGAT1-2(ASK), DGAT com teor de óleo normal da invenção, tal como ZmDGAT1-2(EF09B), permease de aminoácido da invenção, tal como ZmAAP1, PESP da invenção, tal como ZmPESP, proteína ribossômica da invenção, tal como ZmS24, ou proteína transportadora ABC da invenção, tal como ZmABCT, possuirão pelo menos cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência em relação à sequência de aminoácido para a proteína nativa conforme determinado pelos programas de alinhamento de sequência e parâmetros descritos em algum lugar aqui. Uma

variante biologicamente ativa de uma proteína da invenção pode diferir daquela proteína por apenas 1-15 resíduos de aminoácidos, apenas 1-10, tal como 6-10, apenas 5, apenas 4, 3, 2, ou mesmo 1 resíduo de aminoácido.

[129]As proteínas da invenção podem ser alteradas de várias maneiras incluindo substituições de aminoácidos, exclusões, truncações, e inserções. Métodos para tais manipulações são geralmente conhecidos na técnica. Por exemplo, variantes de seqüência de aminoácido e fragmentos da proteína ZmDGAT1-2(ASK), proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo (por exemplo, ZmDGAT1-2(EF09B)), a proteína ZmAAP1, a ZmPESP, a proteína ZmS24 e a proteína ZmABCT podem ser preparadas por mutações no DNA. Métodos para a mutagenese e alterações de polinucleotídeo são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492); Kunkel e outros, (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382; Patente U.S. de número 4.873.192; Walker e Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York) e as referências citadas nesta. Orientação para as substituições de aminoácidos apropriadas que não afetam a atividade biológica da proteína de interesse pode ser encontrada no modelo de Dayhoff e outros. (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), aqui incorporado para referência. Substituições conservativas, tal como a troca de um aminoácido com um outro possuindo propriedades similares, pode ser preferível.

[130]Assim, os genes e os polinucleotídeos da invenção incluem tanto as seqüências que ocorrem naturalmente quanto

as formas mutantes. De maneira semelhante, as proteínas da invenção abrangem tanto as proteínas que ocorrem naturalmente quanto as variações e formas modificadas desta. Tais variantes irão continuar a possuir a atividade desejada. Assim, por exemplo, variantes da proteína ZmDGAT1-2(ASK) continuarão a conceder o fenótipo de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico em uma planta ou parte desta planta. Variantes da proteína ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo (por exemplo, ZmDGAT1-2(EF09B)) continuarão a possuir a atividade desejada de estarem envolvidas na biossíntese de óleo, e portanto quando superexpressadas em uma planta ou parte desta planta, resultarão em um aumento no conteúdo de óleo, conteúdo de ácido oléico e/ou relação entre o ácido oléico e ácido linoléico daquela planta ou parte desta planta. Obviamente, as mutações que serão feitas no DNA que codifica a variante não devem colocar a sequência fora do quadro de leitura e preferivelmente não criarão regiões complementares que poderão produzir estrutura secundária de mRNA. Ver, a Publicação do Pedido de Patente EP de nº 75.444.

[131]Não se espera que as deleções, inserções, e substituições das sequências de proteína abrangidas aqui produzam mudanças radicais nas características da proteína. Entretanto, quando é difícil prever o efeito exato da substituição, deleção ou inserção antes que estas sejam feitas, qualquer um habilitado na técnica irá avaliar que o efeito será avaliado por ensaios de classificação rotineiros.

[132]Polinucleotídeos variantes e proteína também abrangem sequências e proteínas derivadas de um

procedimento mutagênico e recombinogênico tal como combinações aleatórias de DNA (*DNA shuffling*). Com tal procedimento, uma ou mais seqüências codificadoras diferentes para a proteína ZmDGAT1-2(ASK), a proteína ZmDGAT1-2 com teor de óleo normal (por exemplo, ZmDGAT1-2(EF09B)), a proteína ZmAAP, a ZmPESP, a proteína ZmS24, ou as seqüências que codificam a proteína ZmABCT podem ser manipuladas para criar uma nova proteína DGAT1-2, proteína AAP1, PESP, proteína S24 ribossômica 40S ou proteína ABCT possuindo as propriedades desejadas. Desta maneira, as bibliotecas de polinucleotídeos recombinantes são geradas a partir de uma população de polinucleotídeos relacionados compreendendo regiões de seqüência que possuem substancial identidade de seqüência e podem ser de forma homóloga recombinadas *in vitro* ou *in vivo*. Por exemplo, usando-se este método, os motivos de seqüência que condificam um domínio de interesse podem ser combinados aleatoriamente entre a seqüência codificadora para a proteína ZmDGAT1-2(ASK), ZmDGAT1-2 com teor normal de óleo (por exemplo, ZmDGAT1-2(EF09B)), ZmAAP1, ZmPESP, ZmS24 ou ZmABCT da invenção e seqüências codificadoras para outras proteínas DGAT1-2, AAP1, PESP, S24, ABCT respectivas conhecidas para se obter um novo gene codificando para uma proteína com uma propriedade de interesse melhorada. Estratégias para tal combinação aleatória de DNA são conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Crameri e outros (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438, Moore e outros (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang e outros (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramerietal.

(1998) *Nature* 391:288-291; e Patentes U. S. de números 5.605.793 e 5.837.458.

[133]As composições da invenção também incluem moléculas de ácido nucleico isoladas compreendendo a seqüência de nucleotídeo promotora ZmDGAT1-2 (Mo17) (filamento complementar exposto em Id. de Seq. n°: 119); seqüência de nucleotídeo promotora ZmDGAT1-2 (ASK) (filamento complementar exposto em Id. de Seq. n°: 130); seqüência de nucleotídeo promotora ZmAAP1 (exposta em Id. de Seq. n°: 120); seqüência de nucleotídeo promotora ZmPESP (Mo17) (exposta em Id. de Seq. n°: 121); seqüência de nucleotídeo promotora ZmPESP (ASK) (exposta em Id. de Seq. n°: 129); seqüência de nucleotídeo promotora ZmS24 (exposta em Id. de Seq. n°: 122); e seqüência de nucleotídeo promotora ZmABCT (exposta em Id. de Seq. n°: 123). Por "promotor" é objetivado uma região reguladora de DNA compreendendo freqüentemente uma caixa TATA capaz de direcionar a RNA polimerase II para iniciar a síntese de RNA no sítio de iniciação de transcrição apropriado para uma seqüência de codificação particular. Um promotor pode adicionalmente compreender outras seqüências de reconhecimento geralmente posicionadas acima ou 5' em relação a caixa TATA, referido como elementos promotores superiores, que influenciam a taxa de iniciação de transcrição.

[134]É reconhecido que se tendo identificado as seqüências de nucleotídeo para as regiões promotoras aqui divulgadas, elas estão inseridas no estado da técnica para isolar e identificar elementos reguladores adicionais na região 5'-não traduzida à montante da região promotora

particular aqui identificada. Assim, por exemplo, as respectivas regiões promotoras aqui divulgadas podem também compreender elementos reguladores à montante que conferem expressão tecido-preferida das seqüências de nucleotídeo heteróloga operativamente ligada à seqüência promotora divulgada. Veja particularmente, a Patente Australiana de número AU-A-77751/94 e Patentes U. S. de números 5.466.785 e 5.635.618.

[135] Os fragmentos e variantes das seqüências de nucleotídeo promotoras ZmDGAT1-2 (Mo17), AmDGAT1-2 (ASK), ZmAAP1, ZmPESP (Mo17), ZmPESP (ASK), ZmS24 e ZmABCT são também abrangidos pela presente invenção. Por "fragmento" de uma seqüência promotora é objetivado uma porção da seqüência de nucleotídeo promotora. Os fragmentos de uma seqüência de nucleotídeo promotora podem reter atividade biológica e por conseguinte reter sua atividade reguladora transcricional. Assim, por exemplo, menos que a seqüência promotora inteira aqui divulgada pode ser utilizada para direcionar a expressão de uma seqüência de nucleotídeo operativamente ligada de interesse, tal como uma seqüência de nucleotídeo codificando uma proteína heteróloga. Alternativamente, fragmentos de uma seqüência promotora de nucleotídeo que são úteis como marcadores de hibridização geralmente não retêm a atividade biológica. Assim, os fragmentos de uma seqüência promotora de nucleotídeo podem variar de pelo menos cerca de 20 nucleotídeos, cerca de 50 nucleotídeos, cerca de 100 nucleotídeos, e até a seqüência promotora de nucleotídeo de tamanho completo da invenção.

[136] Assim, um fragmento de uma seqüência promotora de nucleotídeo ZmDGAT1-2 (Mo17), ZmDGAT1-2 (ASK), ZmAAP1,

ZmPESP(Mo17), ZmPESP(ASK), ZmS24 ou ZmABCT pode codificar uma porção biologicamente ativa do respectivo promotor, ou pode ser um fragmento que pode ser usado como um marcador de hibridização ou iniciador de PCR usando os métodos divulgados abaixo. Uma porção biologicamente ativa do promotor ZmDGAT1-2 (Mo17), ZmDGAT1-2(ASK), ZmAAP1, ZmPESP(Mo17), ZmPESP(ASK), ZmS24 ou ZmABCT pode ser preparada isolando-se uma porção da respectiva sequência promotora de nucleotídeo da invenção, e analisando-se a atividade da porção do respectivo promotor. As moléculas de ácido nucleico que são fragmentos de uma sequência promotora de nucleotídeo ZmDGAT1-2(Mo17), ZmDGAT1-2(ASK), ZmAAP1, ZmPESP(Mo17), ZmPESP(ASK), ZmS24 ou ZmABCT compreendem pelo menos 16, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 nucleotídeos ou até o número de nucleotídeos presentes em uma sequência promotora de nucleotídeo ZmDGAT1-2(Mo17), ZmDGAT1-2(ASK), ZmAAP1, ZmPESP(Mo17), ZmPESP(ASK), ZmS24 ou ZmABCT de comprimento total aqui divulgada (por exemplo, até 3.000 nucleotídeos para o promotor ZmDGAT1-2(Mo17), a sequência complementar da qual está apresentada em Id. de Seq. n°: 119; até 3.000 nucleotídeos para o promotor AmDGAT1-2(ASK), a sequência complementar da qual está apresentada em Id. de Seq. n°: 130; até 728 nucleotídeos para o promotor ZmAAP1 apresentado em Id. de Seq. n°: 120; até 3.000 nucleotídeos para o promotor ZmPESP(Mo17) apresentado em Id. de Seq. n°: 121); até 3.000 nucleotídeos para o promotor ZmPESP(ASK) apresentado em Id. de Seq. n°: 129); até 3.000 bp para o promotor ZmS24 apresentado em Id. de Seq. n°: 122); até 728 nucleotídeos para o promotor ZmABCT apresentado em Id. de

Seq. nº: 123). Ensaios para determinar a atividade de uma sequência promotora são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, um fragmento promotor ZmDGAT1-2(Mo17) ou variante pode ser operativamente ligado à sequência de nucleotídeo codificando qualquer proteína repórter, tal como a proteína β -glucuronidase (repórter GUS) ou a proteína luciferase. A construção do DNA é inserida no genoma de uma planta ou parte desta planta, e o mRNA ou o nível proteico da sequência repórter é determinado. Ver, por exemplo, Eulgem e outros, (1999) *EMBO Journal* 18: 4689-4699.

[137] Os polinucleotídeos da invenção podem ser usados para isolar as sequências correspondentes de outros organismos, particularmente, outras plantas, mais particularmente outras plantas tipo monocotiledôneas. Desta maneira, métodos tais como PCR, hibridização, e etc. podem ser usados para identificar tais sequências baseadas em sua homologia de sequência para as sequências aqui expostas. Sequências isoladas com base em sua identidade de sequência para a sequência inteira de um *locus* marcador aqui divulgado, incluindo os cinco quadros de leitura abertos para a região de QTL6 aqui divulgada, para uma DGAT com teor de óleo normal aqui divulgada (por exemplo, ZmDGAT1-2(EF09B)), ou para variantes e fragmentos destes, são abrangidas pela presente invenção. Tais sequências incluem sequências que são ortólogas das sequências divulgadas. O termo "ortólogos" pretende significar genes derivados de um gene ancestral comum e que são encontrados em diferentes espécies como um resultado de evolução. Genes encontrado em espécies diferentes são considerados ortólogos quando suas sequências de nucleotídeos e/ou suas sequências de proteína

codificadas compartilham pelo menos 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência. As funções de ortólogos são freqüentemente conservadas entre as espécies. Assim, os polinucleotídeos isolados que codificam para uma proteína DGAT 1-2, uma proteína AAP1, uma PESP, uma proteína S24 ribossômica 40S, ou uma proteína ABCT, e que hibridizam-se sob condições severas às respectivas seqüências aqui divulgadas como Id. de Seq. n^{os}:47 ou 51 (ZmDGAT1-2(ASK) e ZmDGAT1-2(EF09B), respectivamente), 55, 57, 59 e 63, ou às variantes ou fragmentos destas, ou qualquer complemento destas, são abrangidas pela presente invenção. Similarmente, os polinucleotídeos que conferem atividade promotora, e que hibridizam-se sob condições severas ao complemento das respectivas seqüências promotoras aqui divulgadas como Id. de Seq. n^{os}:120, 121, 122, 123, 129 e o complemento de Id. de Seq. n^o: 119 ou o complemento de Id. de Seq. n^o: 130, ou às variantes ou fragmentos destas, ou a qualquer complemento destas, são abrangidos pela presente invenção.

[138]Em um método de PCR, os iniciadores de oligonucleotídeo podem ser designados para uso em reações de PCR para amplificar seqüências de DNA correspondentes a partir de cDNA ou DNA genômico extraído de qualquer planta de interesse. Métodos para designar os iniciadores de PCR e clonagem por PCR são geralmente conhecidos na técnica e estão divulgados em Sambrook e outros, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York). Ver também Innis e outros, eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and*

Applications (Academic Press, New York); Innis e Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); e Innis e Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York). Os métodos conhecidos de PCR incluem, mas não estão limitados a, métodos que usam iniciadores emparelhados, iniciadores aninhados, iniciadores específicos únicos, iniciadores degenerados, iniciadores gene-específicos, iniciadores vetor-específico, iniciadores parcialmente desemparelhado, e etc.

[139] Nas técnicas de hibridização, toda ou parte de um polinucleotídeo conhecido é usada como um marcador que se hibridiza de forma seletiva a outros polinucleotídeos correspondentes presentes em uma população de fragmentos de DNA genômicos clonados ou de fragmentos de cDNA (isto é, bibliotecas genômicas ou de cDNA) de um organismo escolhido. Os marcadores de hibridização podem ser fragmentos de DNA genômicos, fragmentos de cDNA, fragmentos de RNA, ou outros oligonucleotídeos, e podem ser marcados com um grupo detectável tal como ^{32}P , ou qualquer outro marcador detectável. Assim, por exemplo, os marcadores para hibridização podem ser feitos mancando-se oligonucleotídeos sintéticos com base nos polinucleotídeos para os loci marcadores favoráveis da invenção, incluindo Id. de Seq. n^{os}: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 e 45, assim como os quadros de leitura abertos expostos em Id. de Seq. n^o: 47, 51, 55, 57, 59 e 63. Métodos de preparação dos marcadores para hibridização e para construção de cDNA e bibliotecas genômicas são geralmente conhecidos na técnica e estão divulgados em Sambrook e outros, (1989) *Molecular Cloning*:

A Laboratory Manual (2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York).

[140] Por exemplo, o polinucleotídeo ZmDGAT1-2 (ASK) inteiro aqui divulgado como Id. de Seq. n°:47, ou uma ou mais porções deste, ou o polinucleotídeo ZmDGAT1-2 (EF09B) inteiro aqui divulgado como Id. de Seq. n°:51, ou uma ou mais porções deste, pode ser usado como um marcador capaz de hibridizar-se especificamente aos polinucleotídeos DGAT1-2 correspondente e RNAs mensageiros. Para alcançar hibridização específica sob uma variedade de condições, tais marcaodres incluem seqüências que são únicas entre as seqüências de polinucleotídeo DGAT1-2 e possuem preferivelmente pelo menos um tamnaho de cerca de 10 nucleotídeo, e ainda mais preferivelmente pelo menos um tamanho de cerca de 20 nucleotídeos. Tais marcadores podem ser usados para amplificar os polinucleotídeos DGAT1-2 correspondentes, particularmente os polinucleotídeos DGAT1-2 que possuem um ou mais dos polimorfismos identificados em Id. de Seq. n°:47, ou os polinucleotídeos DGAT-12 codificando variantes da proteína DGAT1-2 com teor de óleo normal da invenção, a partir de uma planta escolhida por PCR. Esta técnica pode ser usada para isolar seqüências codificadoras adicionais a partir de uma planta desejada ou como um ensaio de diagnóstico para determinar a presença de seqüências codificadoras em uma planta. As técnicas de hibridização incluem seleção por hibridização de bibliotecas de DNA palqueadas (ou placas ou colônias; ver, por exemplo, Sambrook e outros, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)).

[141]A hibridização de tais seqüências pode ser executada sob condições severas. Por "condições severas" ou "condições de hibridização severas" é objetivado condições sob as quais um marcador irá se hibridizar a sua seqüência alvo a um grau de forma mais detectável que a outras seqüências (por exemplo, pelo menos 2 vezes sobre a base). As condições severas são dependentes da seqüência e serão diferentes em diferentes circunstâncias. Controlando-se a severidade das condições de hibridização e/ou de lavagem, as seqüências alvo que são 100% complementares ao marcador podem ser identificadas (marcador homólogo). Alternativamente, as condições de severidade podem ser ajustadas para permitir algum desemparelhamento nas seqüências de modo que graus de similaridade menores sejam detectados (marcador heterólogo). Geralmente, um marcador é menor que cerca de 1.000 nucleotídeos de tamanho, preferivelmente menor que 500 nucleotídeos de tamanho.

[142]Tipicamente, condições severas serão àquelas nas quais a concentração de sal é menor que cerca de 1,5 M de íons Na, tipicamente uma concentração de cerca de 0,01 a 1,0 M de íons Na (ou outros sais) a um pH variando de 7,0 a 8,3 e a temperatura é de pelo menos cerca de 30°C para marcadores pequenos (por exemplo, de 10 a 50 nucleotídeos) e pelo menos cerca de 60°C para marcadores longos (por exemplo, mais de 50 nucleotídeos). As condições severas podem também ser alcançadas com a adição de agentes desestabilizantes tal como formamida. Condições de baixa severidade exemplares incluem hibridização com uma solução tampão de 30 a 35% de formamida, NaCl 1M, SDS (sulfato de dodecil sódico) 1% a 37°C, e uma lavagem em SSC de 1X a 2X

(SSC 20X = NaCl 3M/citrato trissódico 0,3M) a uma temperatura entre 50 e 55°C. Condições de severidade moderadas exemplares incluem hibridização em formamida 40 a 45%, NaCl 1M, SDS 1% a 37°C, e uma lavagem em SSC de 0,5X a 1X a uma temperatura entre 55 e 60°C. Condições de severidade altas exemplares incluem hibridização em formamida 50%, NaCl 1M, SDS 1% a 37°C, e uma lavagem em SSC 0,1X a uma temperatura entre 60 e 65°C. Opcionalmente, os tampões de lavagem podem compreender de cerca de 0,1% a cerca de 1% de SDS. A duração da hibridização é geralmente menor que cerca de 24 horas, freqüentemente de cerca de 4 a cerca de 12 horas. A duração do tempo de lavagem será de pelo menos um período de tempo suficiente para alcançar o equilíbrio.

[143]A especificidade é tipicamente a função das lavagens pós-hibridização, sendo fatores importantes a força iônica e a temperatura da solução de lavagem final. Para os híbridos DNA-DNA, o T_m pode ser aproximado a partir da equação de Meinkoth e Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ de GC}) - 0,61(\% \text{ de form.}) - 500/L$; onde M é a molaridade dos cátions monovalentes, % de GC é o percentual de nucleotídeos guanosina e citosina no DNA, % de form. é o percentual de formamida na solução de hibridização, e L é o comprimento do híbrido nos pares de base. A T_m é a temperatura (sob força iônica e pH definidos) na qual 50% de uma sequência alvo complementar hibridiza-se a um marcador perfeitamente emparelhado. A T_m é reduzida em cerca de 1°C para cada 1% de desemparelhamento; assim, T_m , hibridização, e/ou condições de lavagem podem ser ajustados para hibridizar às

seqüências da identidade desejada. Por exemplo, se seqüências com identidade > 90% são procuradas, a T_m pode ser diminuída 10°C. Geralmente, condições severas são selecionadas para estarem cerca de 5°C abaixo do ponto de fusão térmica (T_m) para a seqüência específica e seu complemento a uma força iônica e pH definidos. Entretanto, condições bastante severas podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 1, 2, 3 ou 4°C abaixo do ponto de fusão térmica (T_m); condições moderadamente severas podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 6, 7, 8, 9 ou 10°C abaixo do ponto de fusão térmica (T_m); condições de severidade baixas podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 11, 12, 13, 14, 15 ou 20°C abaixo do ponto de fusão térmica (T_m). Usando-se a equação, composições de hibridização ou lavagem, e a T_m desejada, aqueles habilitados na técnica irão compreender que variações na severidade das soluções de hibridização e/ou lavagem estão inerentemente descritas. Se o grau desejado de desemparelhamento resulta em uma T_m de menos de 45°C (solução aquosa) ou 32°C (solução de formamida), é preferido aumentar a concentração de SSC de modo que uma temperatura mais alta possa ser usada. Um guia extenso para a hibridização de ácidos nucléicos é encontrado em Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, New York); e Ausubel e outros, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Ver Sambrook e outros (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press,

Plainview, New York).

[144] Os seguintes termos são usados para descrever os relacionamentos de seqüência entre dois ou mais polinucleotídeos ou polipeptídeos: (a) "seqüência de referência", (b) "janela de comparação", (c) "identidade de seqüência", e (d) "percentual de identidade de seqüência".

[145] (a) Conforme aqui usado, a expressão "seqüência de referência" é uma seqüência definida usada como uma base para uma comparação de seqüência. Uma seqüência de referência pode ser um subconjunto ou a integridade de uma seqüência especificada, por exemplo, como um segmento de um cDNA de comprimento total ou seqüência do gene, ou o cDNA completo ou seqüência do gene.

[146] (b) Conforme aqui usado, a expressão "janela de comparação" faz referência a um segmento contínuo e especificado de uma seqüência de polinucleotídeo, onde a seqüência de polinucleotídeo na janela de comparação pode compreender adições ou deleções (isto é, espaços) comparada à seqüência de referência (que não compreende adições ou deleções) para alinhamento ideal dos dois polinucleotídeos. Geralmente, a janela de comparação possui pelo menos 20 nucleotídeos contínuos de tamanho, e opcionalmente pode ser de 30, 40, 50, 100 ou maior. Aqueles habilitados na técnica compreendem que para evitar uma alta similaridade a uma seqüência de referência devida à inclusão de espaços na seqüência de polinucleotídeo, uma penalidade de intervalo é tipicamente introduzida e é subtraída a partir do número de emparelhamentos.

[147] Métodos de alinhamento de seqüências para comparação são bem conhecidos na técnica. Assim, a

determinação do percentual de identidade de sequência entre quaisquer duas seqüências pode ser executada usando-se um algoritmo matemático. Exemplos não limitantes de tais algoritmos matemáticos são o algoritmo de Myers e Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17; o algoritmo de alinhamento local de Smith e outros (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; algoritmo de alinhamento global de Needleman e Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; método de pesquisa por alinhamento local de Pearson e Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-2448; o algoritmo de Karlin e Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, modificado como em Karlin e Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877.

[148]As implementações de computador destes algoritmos matemáticos podem ser utilizadas para comparação de seqüências para determinar a identidade de sequência. Tais implementações incluem, mas não estão limitadas a: CLUSTAL no programa PC/Gene (disponível a partir de Intelligenetics, Mountain View, California); o programa ALIGN (versão 2.0) e GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA e TFASTA no pacote de software GCG Wisconsin Genetics, Versão 10 (disponível a partir de Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, California, USA). Os alinhamentos que usam estes programas podem ser executados usando os parâmetros padrões. O programa CLUSTAL é bem descrito por Higgins e outros. (1988) *Gene* 73:237-244 (1988); Higgins e outros (1989) *CABIOS* 5:151-153; Corpet e outros (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90, Huang e outros (1992) *CABIOS* 8:155-65; e Pearson e outros (1994) *Meth. Mol. Biol.* 24:307-331. O programa ALIGN é baseado no algoritmo de Myers e Miller (1988) *supra*. Uma tabela de resíduo de peso PAM120, uma

penalidade de comprimento de intervalo de 12 e uma penalidade de intervalo de 4 podem ser usadas com o programa ALIGN quando se está comparando seqüências de aminoácido. Os programas BLAST de Altschul e outros (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403 são baseados no algoritmo de Karlin e Altschul (1990) *supra*. As pesquisas de nucleotídeo BLAST podem ser executadas com o programa BLASTN, pontuação = 100, tamanho de palavra = 12, para se obter seqüências de nucleotídeo homólogas a uma seqüência de nucleotídeo codificando uma proteína da invenção. As pesquisas de proteína BLAST podem ser executadas com o programa BLASTX, pontuação = 50, tamanho de palavra = 3, para se obter seqüências de aminoácidos homólogas a uma proteína ou polipeptídeo da invenção. Para se obter alinhamentos intervalados para propósitos de comparação, o Gapped BLAST (em BLAST 2.0) pode ser utilizado conforme descrito em Altschul e outros. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Alternativamente, PSI-BLAST (em BLAST 2.0) pode ser usado para executar uma pesquisa repetida que detecta relações distantes entre as moléculas. Ver Altschul e outros (1997) *supra*. Quando se utiliza BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST, os parâmetros dos respectivos programas (por exemplo, BLASTN para seqüências de nucleotídeo, BLASTX para proteínas) podem ser usados. Veja www.ncbi.nlm.nih.gov. O alinhamento pode também ser executado manualmente por inspeção.

[149]A menos que de outra forma afirmado, os valores de identidade de seqüência/similaridade aqui se referem ao valor obtido usando GAP versão 10 usando-se os seguintes parâmetros: % de identidade e % de similaridade para uma seqüência de nucleotídeo usando-se *GAP Weight* de 50 e

Length Weight de 3, e a matriz de pontuação *nwsgapdna.cmp*; % de indentidade e % de similaridade para uma sequência de aminoácido usando *GAP Weight* de 8 e *Length Weight* de 2, e a matriz de pontuação BLOSUM62. Por "programa equivalente" é objetivado qualquer programa de comparação de sequência que, para quaisquer duas sequências em questão, gera um alinhamento possuindo emparelhamentos de nucleotídeo idênticos ou de resíduos de aminoácido e um percentual de identidade de sequência idêntico quando comparadas ao alinhamento correspondente gerado pelo GAP Versão 10.

[150] GAP usa o algoritmo de Needleman e Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453, para descobrir o alinhamento de duas sequências completas que maximiza o número de emparelhamentos e minimiza o número de intervalos. O GAP considera todos os possíveis alinhamentos e posições do intervalo e cria o alinhamento com o maior número de bases emparelhadas e o menor número de intervalos. Ele leva em conta a provisão de uma penalidade de criação de intervalo e uma penalidade de extensão de intervalo em unidades de bases emparelhadas. O GAP deve tirar proveito do número de penalidades de criação de intervalo dos emparelhamentos de cada intervalo que ele insere. Se uma penalidade de extensão de intervalo maior que zero é escolhida, o GAP deve, além disso, tirar proveito para cada intervalo inserido do tamanho do intervalo vezes a penalidade de extensão do intervalo. Os valores padrões da penalidade de criação de intervalo e da penalidade de extensão do intervalo na Versão 10 do GCG Wisconsin Genetics Software Package para sequências de proteína são 8 e 2, respectivamente. Para as sequências de nucleotídeo, a

penalidade de criação de intervalo padrão é 50 enquanto a penalidade de extensão do intervalo padrão é 3. As penalidades de criação de intervalo e de extensão de intervalo podem ser expressas como um inteiro selecionado a partir do grupo de inteiros consistindo de 0 a 200. Assim, por exemplo, penalidades de criação de intervalo e de extensão de intervalo podem ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ou maiores.

[151]O GAP apresenta um elemento da família de alinhamentos melhores. Pode haver vários elementos desta família, mas nenhum outro elemento possui uma qualidade melhor. O GAP mostra quatro figuras de mérito para alinhamentos: Qualidade, Proporção, Identidade e Similaridade. A Qualidade é a medida maximizada a fim de alinhar as seqüências. A proporção é a qualidade dividida pelo número de bases no menor segmento. O percentual de identidade é o percentual dos símbolos que realmente se emparelham. O percentual de similaridade é o percentual dos símbolos que são similares. Os símbolos que estão através dos intervalos são ignorados. Uma similaridade é pontuada quando o valor da matriz de pontuação para um par de símbolos é maior ou igual a 0,50, o limite de similaridade. A matriz de pontuação usada na Versão 10 do GCG Wisconsin Genetics Software Package é BLOSUM62 (ver Henikoff e Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915).

[152](c) Conforme aqui usado, "identidade de seqüência" ou "identidade" no contexto das duas seqüências de polinucleotídeo ou polipeptídeo faz referência ao resíduo nas duas seqüências que são os mesmos quando

alinhas para correspondência máxima sobre uma janela de comparação específica. Quando o percentual de identidade de sequência é usado em referência às proteínas, é reconhecido que as posições do resíduo que não sejam idênticos freqüentemente diferem por substituições de aminoácido conservativas, onde os resíduos de aminoácido são substituídos por outros resíduos de aminoácido com propriedades químicas similares (por exemplo, carga ou hidrofobicidade) e portanto não mudam as propriedades funcionais da molécula. Quando as seqüências diferem em substituições conservativas, o percentual de identidade de sequência pode ser ajustado para cima para corrigir a natureza conservativa da substituição. Seqüências que diferem por tais substituições conservativas são ditas como tendo "similaridade de seqüência" ou "similaridade". Meios para fazer este ajuste são bem conhecidos daqueles habilitados na técnica. Tipicamente, isto envolve pontuar uma substituição conservativa como um desemparelhamento parcial em vez de completo, assim aumentando o percentual de identidade de seqüência. Assim, por exemplo, onde a um aminoácido idêntico é dada uma pontuação de 1 e a uma substituição não conservativa é dada uma pontuação de zero, a uma substituição conservativa é dada uma pontuação entre zero e 1. A pontuação das substituições conservativas é calculada, por exemplo, conforme implementado no programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

[153] (d) Conforme aqui usado, "percentual de identidade de seqüência" significa o valor determinado pela comparação de duas seqüências perfeitamente alinhadas sobre uma janela de comparação, onde a porção da seqüência de

polinucleotídeo na janela de comparação pode compreender adições ou deleções (isto é, intervalos) conforme comparada à sequência de referência (que não compreende adições ou deleções) para alinhamento ideal das duas sequências. O percentual é calculado pela determinação do número de posições nas quais a base do ácido nucléico ou resíduo de aminoácido idênticos ocorre em ambas as sequências para produzir o número de posições emparelhadas, dividindo-se o número de posições emparelhadas pelo número total de posições na janela de comparação, e multiplicando-se o resultado por 100 para produzir o percentual de identidade de sequência.

(D) Cassete de Expressão

[154]O uso do termo "polinucleotídeo" não é objetivado para limitar a presente invenção aos polinucleotídeos que compreendem DNA. Aqueles habilitados na técnica irão reconhecer que os polinucleotídeos, podem compreender ribonucleotídeos e combinações de ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos. Tais desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos incluem tanto moléculas que ocorrem naturalmente quanto análogos sintéticos. Os polinucleotídeos da invenção também abrangem todas as formas de sequências incluindo, mas não limitadas às formas de filamento único, formas de duplo filamento, grampo de cabelo, estruturas "stem-and-loop", e etc.

[155]Quaisquer sequências de polinucleotídeo associadas ao alto teor de óleo ou alto teor de ácido oléico na região de QTL6 que confira o traço fenotípico de alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico e/ou relação aumentada entre o ácido oléico e ácido linoléico,

incluindo as seqüências de *loci* marcadores expostas em Id. de Seq. n^{os}:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 e 45, e as seqüências codificadoras expostas em Id. de Seq. n^{os}:47, 55, 57, 59 e 63, assim como as variantes e fragmentos destas, podem ser incluídas como parte de um cassete de expressão. Assim, por exemplo, os polinucleotídeos codificando a DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico (isto é, ZmDGAT1-2(ASK)), permease de aminoácido, PESP, proteína ribossômica ou a proteína transportadora ABC da invenção podem ser fornecidas em cassetes de expressão para expressão na planta de interesse. Alternativamente, ou em adição a uma ou mais destas seqüências de *loci* marcadores, o polinucleotídeo codificando a DGAT com teor de óleo normal da invenção (por exemplo, Id. de Seq. n^o:51 codificando ZmDGAT1-2(EF09B) de Id. de Seq. n^o:52), assim como as variantes e fragmentos destas, podem ser incluídas no mesmo ou em diferentes cassetes de expressão para fornecer superexpressão da DGAT com teor de óleo normal. Destaforma, o cassete irá incluir as seqüências reguladoras 5' e 3' operativamente ligadas a um polinucleotídeo codificando a DGAT com alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, DGAT com teor normal de óleo, permease de aminoácido, PESP, proteína ribossômica ou a proteína transportadora ABC da invenção. "Operativamente ligado" é objetivado para significar uma ligação funcional entre dois ou mais elementos. Por exemplo, uma ligação operável entre um polinucleotídeo de interesse e uma seqüência reguladora (isto é, um promotor) é uma ligação funcional que permite a expressão do polinucleotídeo de interesse. Elementos

operativamente ligados podem ser contínuos ou não contínuos. Quando usada para se referir à união de duas regiões codificadoras de proteína, a expressão "operativamente ligada" objetiva significar que as regiões codificadoras estão no mesmo quadro de leitura. O cassete pode conter adicionalmente pelo menos um gene adicional para ser co-transformado no organismo. Alternativamente, o(s) gene(s) adicional(ais) pode(m) ser fornecido(s) em cassetes de expressão múltiplos. Tal cassete de expressão é fornecido com uma pluralidade de sítios de restrição e/ou sítios de recombinação para inserção do polinucleotídeo de interesse, por exemplo, polinucleotídeos codificando a DGTA de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, a DGAT com teor normal de óleo, permease de aminoácido, PESP, proteína ribossômica ou a proteína transportadora ABC da invenção, para estar sob regulação transcricional das regiões reguladoras. O cassete de expressão pode adicionalmente conter genes marcadores selecionáveis.

[156]O cassete de expressão incluirá na direção 5'-3' de transcrição, uma região de início transcricional e traducional (isto é, um promotor), um polinucleotídeo da invenção, por exemplo, um polinucleotídeo codificando a DGTA de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, a DGAT com teor normal de óleo, permease de aminoácido, PESP, proteína ribossômica ou a proteína transportadora ABC da invenção, e uma região de finalização transcricional e traducional (isto é, uma região de finalização) funcional em plantas. As regiões reguladoras (isto é, promotores, regiões reguladoras transcricionais e regiões de finalização traducional) e/ou o polinucleotídeo da invenção

podem ser nativos/análogos à célula hospedeira ou entre si. Alternativamente, as regiões reguladoras e/ou o polinucleotídeo da invenção podem ser heterólogos à célula hospedeira ou entre si. Conforme aqui usado, "heterólogo" em referência a uma sequência é uma sequência que se origina de uma espécie estranha, ou, se da mesma espécie, é substancialmente modificada a partir de sua forma nativa em composição e/ou *locus* genômico por intervenção humana deliberada. Por exemplo, um promotor operativamente ligado a um polinucleotídeo heterólogo é de uma espécie diferente daquela espécie a partir da qual o polinucleotídeo foi derivado, ou, se da mesma espécie ou de espécie análoga, um ou ambos são substancialmente modificados a partir de sua forma original e/ou *locus* genômico, ou o promotor não é o promotor nativo para o polinucleotídeo operativamente ligado. Conforme aqui usado, um gene quimérico compreende uma sequência de codificação operativamente ligada a uma região de iniciação de transcrição que é heteróloga à sequência de codificação.

[157]Embora possa ser ideal expressar as sequências usando-se promotores heterólogos, as sequências promotoras nativas podem ser usadas. Tais construções podem mudar os níveis de expressão da DGTA de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, a DGAT com teor normal de óleo, permease de aminoácido, PESP, proteína ribossômica ou a proteína transportadora ABC da invenção na planta ou célula da planta. Assim, o fenótipo da planta ou célula de planta pode ser alterado.

[158]Desta maneira, a expressão da DGTA de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, por exemplo, a ZmDGAT1-

2(ASK) de Id. de Seq. n°:48, codificada, por exemplo, pelo polinucleotídeo ZmDGAT1-2(ASK) exposto em Id. de Seq. n°:47, pode ser direcionada por sua seqüência promotora nativa (o filamento complementar ao promotor ZmDGAT1-2(ASK) está exposto em Id. de Seq. n°: 130), ou uma seqüência promotora para um polipeptídeo DGAT relacionado, por exemplo, a seqüência promotora ZmDGAT1-2(Mo17) (o filamento complementar ao promotor ZmDGAT1-2(Mo17) está exposto em Id. de Seq. n°: 119) ou variantes biologicamente ativas destes.

[159]De maneira semelhante, a expressão da DGTA de teor de óleo normal, por exemplo, a ZmDGAT1-2(Mo17) de Id. de Seq. n°:50, codificada, por exemplo, pelo polinucleotídeo ZmDGAT1-2(Mo17) exposto em Id. de Seq. n°:49, pode ser direcionada por sua seqüência promotora nativa (o filamento complementar ao promotor ZmDGAT1-2(Mo17) está exposto em Id. de Seq. n°: 119), ou uma seqüência promotora para um polipeptídeo DGAT relacionado, por exemplo, a seqüência promotora ZmDGAT1-2(ASK) (o filamento complementar ao promotor ZmDGAT1-2(ASK)) está exposto em Id. de Seq. n°: 130) ou variantes biologicamente ativas destes.

[160]Similarmente, a expressão da ZmAAP1 de Id. de Seq. n°:56, codificada, por exemplo, pelo polinucleotídeo ZmAAP1 exposto em Id. de Seq. n°:55, pode ser direcionada por sua seqüência promotora nativa, exposta como os nucleotídeos 6161-6888 de Id. de Seq. n°: 117 (ver também Id. de Seq. N°: 120) ou uma variante biologicamente ativa destes. A expressão da ZmPESP de Id. de Seq. n°:58, codificada, por exemplo, pelo polinucleotídeo ZmPESP

exposto em Id. de Seq. nº:57, pode ser direcionada por sua seqüência promotora nativa, exposta como os nucleotídeos 153888-156887 de Id. de Seq. nº: 116 (ver também Id. de Seq. Nº: 121) uma variante biologicamente ativa destes (ver, por exemplo, a seqüência promotora ZmPESP(ASK) exposta em Id. de Seq. nº: 129). A expressão da ZmS24 de Id. de Seq. nº:60, codificada, por exemplo, pelo polinucleotídeo ZmS24 exposto em Id. de Seq. nº:59, pode ser direcionada por sua seqüência promotora nativa, exposta como os nucleotídeos 1824-4823 de Id. de Seq. nº: 117 (ver também Id. de Seq. Nº: 122) ou uma variante biologicamente ativa destes. A expressão da ZmABCT de Id. de Seq. nº:64, codificada, por exemplo, pelo polinucleotídeo ZmABCT exposto em Id. de Seq. nº:63, pode ser direcionada por sua seqüência promotora nativa, exposta como os nucleotídeos 254826-257825 de Id. de Seq. nº: 116 (ver também Id. de Seq. Nº: 123) ou uma variante biologicamente ativa destes.

[161]A região de finalização pode ser nativa com a região de iniciação transcricional, pode ser nativa com o polinucleotídeo de interesse operativamente ligado, pode ser nativa com o hospedeiro da planta, ou pode ser derivada de uma outra fonte (isto é, estranha ou heteróloga) em relação ao promotor, polinucleotídeo de interesse, hospedeiro de planta ou qualquer combinação destes. Regiões de terminação convenientes estão disponíveis a partir de Ti-plasmídeo de *A. tumefaciens*, tal como as regiões de terminação de sintase de octopina e sintase de nopalina. Ver também Guerineau e outros (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon e outros (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen e outros, (1990)

Plant Cell 2:1261-1272; e Munroe e outros (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas e outros (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903, e Joshi e outros (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:9627-9639.

[162]Onde apropriado, os polinucleotídeos podem ser otimizados para expressão aumentada na planta transformada. Isto é, os polinucleotídeos podem ser sintetizados usando-se códons de planta preferida para expressão melhorada. Ver, por exemplo, Campbell e Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 para uma discussão de uso de códom hospedeiro preferido. Métodos estão disponíveis na técnica para sintetizar os genes de planta preferida. Veja, por exemplo, as Patentes U. S. de números 5.380.831 e 5.436.391, e Murray e outros, (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, aqui incorporada para referência.

[163]Sabe-se que as modificações de sequência adicionais melhoram a expressão do gene em uma célula hospedeira. Estas incluem a eliminação de seqüências codificando sinais de poliadenilação espúria, sinais de sítio de junção exon-intron, repetições semelhante a transposon, e outras tais seqüências bem caracterizadas que podem ser deletérias à expressão do gene. O conteúdo de G-C da seqüência pode ser ajustado a níveis médios para um dado hospedeiro celular, conforme calculado com referência aos genes conhecidos expressos na célula hospedeira. Quando possível, a seqüência é modificada para evitar as previstas estruturas de mRNA secundário de grampo de cabelo.

[164]O cassete de expressão pode adicionalmente conter seqüências líderes 5'. Tais seqüências líderes podem atuar para melhorar a tradução. Os líderes de tradução são

conhecidos na técnica e incluem: líderes de picomavírus, por exemplo, líder de EMCV (região não codificadora 5' de encefalomiocardite) (Elroy-Stein e outros (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6126-6130); líder de potivírus, por exemplo, líder TEV (Vírus "Etch" do Fumo) (Gallie e outros (1995) *Gene* 165(2):233-238), líder de MDMV (Vírus do Mosaico do Milho ("Maize Dwarf Mosaic Virus")) (*Virology* 154:9-20), e proteína de ligação de cadeia extensa de imunoglobulina humana (BiP) (Macejak e outros (1991) *Nature* 353:90-94); líder não traduzido do mRNA de proteína da cobertura de vírus do mosaico de alfafa (AMV RNA 4) (Jobling e outros (1987) *Nature* 325:622-625); líder de vírus do mosaico de fumo (TMV) (Gallie e outros (1989) em *Molecular Biology of RNA*, ed. Cech (Liss, New York), pág. 237-256); e líder de "Vírus do Mosqueado Clorótico do Milho" (MCMV) (Lommel e outros (1991) *Virology* 81:382-385). Ver também Della-Cioppa e outros (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968.

[165]Na preparação do cassete de expressão, os vários fragmentos de DNA podem ser manipulados, de modo a atender à necessidade de seqüências de DNA na orientação adequada e, conforme apropriado, no quadro de leitura adequado. Para este fim, adaptadores ou ligantes podem ser empregados para unir os fragmentos de DNA ou outras manipulações podem ser envolvidas para atender à necessidade por sítios de restrição convenientes, remoção de DNA supérfluo, remoção de sítios de restrição, e etc. Para este propósito, a mutagênese *in vitro*, reparação do iniciador, restrição, fortalecimento, ressubstituições. Por exemplo, transições e transversões, podem estar envolvidas.

[166]Vários promotores podem ser usado na prática da invenção, incluindo o promotor nativo da sequência de polinucleotídeo de interesse. Os promotores podem ser selecionados com base no resultado desejado. Os ácidos nucleicos podem ser combinados com promotores constitutivos, tecido-preferido ou outros promotores para expressão em plantas.

[167]Tais promotores constitutivos incluem, por exemplo, o promotor central do promotor Rsyn7 e outros promotores constitutivos divulgados em WO 99/43838 e Patente U. S. de número 6.072.050; o promotor 35S CaMV central (Odell e outros, (1985) *Nature* 313:810-812); actina de arroz (McElroy e outros, (1990) *Plant Cell* 2:163-171); ubiquitina (Christensen e outros (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 e Christensen e outros (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last e outros (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten e outros (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730); promotor ALS (Patente U. S. de número 5.659.026) e etc. Outros promotores constitutivos incluem, por exemplo, as Patentes U. S. de números 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; 5.608.142 e 6.177.611.

[168]Os promotores regulados quimicamente podem ser usados para modular a expressão de um gene em uma planta através da aplicação de um regulador químico exógeno. Dependendo do objetivo, o promotor pode ser um promotor indutível quimicamente, onde a aplicação do produto químico induz a expressão do gene, ou um promotor reprimível quimicamente, onde a aplicação do produto químico reprime a expressão do gene. Os promotores indutíveis quimicamente

são conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados ao promotor In2-2 de milho, que é ativado por herbicidas de benzenossulfonamida e safeners, o promotor GST de milho, que é ativador por compostos hidrofóbicos eletrofílicos que são usados como herbicidas pré-emergentes, e o promotor PR-1a de tabaco, que é ativado por ácido salicílico. Outros promotores regulados quimicamente de interesse incluem promotores responsivos a esteróides (veja, por exemplo, o promotor indutível por glicocorticóide em Schena e outros (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10421-10425; McNellis e outros (1998) *Plant J.* 14(2):247-257) e promotores indutíveis por tetraciclina e reprimíveis por tetraciclina (veja, por exemplo, Gatz e outros (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237), e Patentes U. S. de números 5.814.618 e 5.789.156), aqui incorporadas para referência.

[169] Os promotores de tecido preferido podem ser utilizados para objetiva a expressão melhorada da sequência de interesse, por exemplo, a DGTA de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, a DGAT com teor normal de óleo, permease de aminoácido, PESP, proteína ribossômica e/ou a proteína transportadora ABC da invenção, dentro de um tecido de planta particular. Os promotores de tecido preferido incluem Yamamoto e outros, (1997) *Plant Cell* 12:2255; e Kawamata e outros (1997) *Plant Cell Physiol.* 38(7):792-803; Hansen e outros (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3):337-343; Russell e outros (1997) *Transgenic Res.* 6(2): 157-168, Rinehart e outros, (1996) *Plant Physiol.* 112(3):1331-1341; Van Camp e outros (1996) *Plant Physiol.* 112(2):525-535; Canevascini e outros (1996) *Plant Physiol.*

112(2):513-524; Yamamoto e outros (1994) *Plant Cell Physiol.* 35(5):773-778; Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:181-196, Orozco e outros (1993) *Plant Mol Biol.* 23(6): 1129-1138; Matsuoka e outros (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590; e Guevara-Garcia e outros (1993) *Plant J.* 4(3):495-505. Tais promotores podem ser modificados, se necessário, para expressão mais fraca.

[170] Promotores de "semente preferida" incluem os promotores "específicos a semente" (aqueles promotores ativos durante o desenvolvimento da semente tais como os promotores das proteínas de armazenagem de semente) assim como os promotores de "germinação de semente" (aqueles promotores ativos durante a germinação da semente). Ver Thompson e outros (1989) *BioEssays* 10:108, aqui incorporada para referência. Tais promotores de semente preferida incluem, mas não estão limitados a Cim1 (mensagem induzida por citoquina); cZ19B1 (zeína de 19 kDa de milho); milps (mio-inositol-1-fosfato sintase) (veja WO 00/11177 e Patente U. S. de número 6.225.529; aqui incorporada para referência). A gama-zeína é um promotor específico a endosperma. Globulina 1 (Glb-1) é um promotor específico a embrião representativo. Para dicotilédones, os promotores específicos a semente incluem, mas não estão limitados a β -faseolina de feijão, napina, β -conglícinina, lecitina de soja, cruciferina e etc. Para monocotilédones, os promotores específicos a semente incluem, mas não estão limitados a zeína de 15 kDa de milho, zeína de 22 kDa, zeína de 27 kDa, gama-zeína, ceráceos, *shrunken* 1, *shrunken* 2, Globulina 1, etc. Veja também WO 00/12733, onde os promotores de semente preferida dos genes *end1* e *end2* são

divulgados; aqui incorporados por referência.

[171]O cassete de expressão pode também compreender um gene marcador selecionável para a seleção de células transformadas. Os genes marcadores selecionáveis são utilizados para a seleção de células ou tecidos transformados. Os genes marcadores incluem genes que codificam resistência a antibiótico, tais como aqueles que codificam a neomicina fosfotransferase II (NEO) e higromicina fosfotransferase (HPT), assim como genes que conferem resistência a compostos herbicidas, tais como glufosinato de amônio, bromoxinil, imidazolinonas e 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D). Marcadores selecionáveis adicionais incluem marcadores fenotípicos tais como β -galactosidase e proteínas fluorescentes tais como proteína verde fluorescente (GFP) (Su e outros (2004) *Biotechnol Bioeng* 55:610-9 e Fetter e outros (2004) *Plant Cell* 76:215-28), proteína ciano fluorescente (CYP) (Bolte e outros (2004) *J. Cell Science* 117:943-54 e Kato e outros (2002) *Plant Physiol* 129:913-42), e proteína amarela fluorescente (PhiYFP™ de Evrogen, veja, Bolte e outros (2004) *J. Cell Science* 117:943-54). Para marcadores selecionáveis adicionais, veja geralmente, Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3:506-511; Christopherson e outros, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6314-6318; Kuziel e outros (1992) *Cell* 71:63-72; Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.* 6:2419-2422; Barkley e outros (1980) em *The Operon*, páginas 177-220; Hu e outros (1987) *Cell* 48:555-566; Brown e outros (1987) *Cell* 49:603-612; Figge e outros (1988) *Cell* 52:713-722; Deuschle e outros (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5400-5404; Fuerst e outros (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 86:2549-2553; Deuschle e outros (1990) *Science* 248:480-483; Gossen (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Reines e outros (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1917-1921; Labow e outros (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-3356; Zambretti e outros (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3952-3956; Bairn e outros (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5072-5076; Wyborski e outros (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) *Topics Mol. Struc. Biol.* 10:143-162; Degenkolb e outros (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1591-1595; Kleinschmidt e outros (1988) *Biochemistry* 27:1094-1104; Bonin (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Gossen e outros (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551; Oliva e outros (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:913-919; Hlavka e outros (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin); Gill e outros (1988) *Nature* 334:721-724. Tais divulgações estão aqui incorporadas por referência.

[172]A lista acima de genes marcadores selecionáveis não é objetivada para ser limitante. Qualquer gene marcador selecionável pode ser usado na presente invenção.

(E) Métodos de Introdução do Polinucleotídeo Recombinante em uma Planta ou Parte desta Planta

[173]Os métodos da invenção envolvem introduzir um polipeptídeo ou polinucleotídeo em uma planta. "Introduzir" é objetivado para significar apresentar à planta o polinucleotídeo ou polipeptídeo de tal forma que a seqüência ganhe acesso ao interior de uma célula da planta. Os métodos da invenção não dependem de um método particular para introduzir uma seqüência em uma planta, apenas que o

polinucleotídeo ou polipeptídeo ganha acesso ao interior de pelo menos uma célula da planta. Métodos para introduzir o polinucleotídeo ou polipeptídeo em plantas são conhecidos na técnica incluindo, mas não limitados a, métodos de transformação estável, métodos de transformação transitória, e métodos mediados por vírus.

[174] Por "transformação estável" é objetivado que a construção de nucleotídeo introduzida em uma planta integre-se dentro do genoma da planta e seja capaz de ser herdado pela prole deste. "Transformação transitória" é objetivada para significar que um polinucleotídeo é introduzido na planta e não se integra no genoma da planta ou um polipeptídeo é introduzido em uma planta.

[175] Os protocolos de transformação assim como os protocolos para a introdução de seqüências de polipeptídeos e polinucleotídeos em plantas podem variar dependendo do tipo de planta ou célula de planta, isto é, monocotilédone ou dicotilédone, objetivado para transformação. Métodos adequados de introdução de polipeptídeos e polinucleotídeos em células de planta incluem microinjeção (Crossway e outros (1986) *BioTechniques* 4:320-334), eletroporação (Riggs e outros (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606, transformação mediada por *Agrobacterium* (Patente U.S. de número 5.563.055 e Patente U.S. de número 5.981.840), transferência de gene direta (Paszkowski e outros (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722), e aceleração balística de partícula (veja, por exemplo, Patente U. S. de número 4.945.050; Patente U. S. de número 5.879.918; Patentes U. S. de números 5.886.244 e 5.932.782; Tomes e outros (1995) *em Plant Cell, Tissue, e Organ Culture: Fundamental Methods*,

ed. Gamborg e Phillips (Springer-Verlag, Berlin); McCabe e outros (1988) *Biotechnology* 6:923-926; e transformação de Lec1 (WO 00/28058). Veja também Weissinger e outros (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477; Sanford e outros (1987) *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (cebola); Christou e outros (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674 (soja); McCabe e outros (1988) *BioTechnology* 6:923-926 (soja); Finer e McMullen (1991) *In Vitro CellDev. Biol.* 27P:175-182 (soja); Singh e outros (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324 (soja); Datta e outros (1990) *Biotechnology* 8:736-740 (arroz); Klein e outros (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4305-4309 (milho); Klein e outros (1988) *Biotechnology* 6:559-563 (milho); Patentes U. S. de números 5.240.855; 5.322.783 e, 5.324.646; Klein e outros (1988) *Plant Physiol.* 91:440-444 (milho); Fromm e outros (1990) *Biotechnology* 8:833-839 (milho); Hooykaas-Van Slogteren e outros (1984) *Nature (London)* 311:763-764; Patente U. S. de número 5.736.369 (cereais); Bytebier e outros (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349 (Liliaceae); De Wet e outros (1985) em *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman e outros (Longman, New York), páginas 197-209 (pólen); Kaeppler e outros (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418 e Kaeppler e outros (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566 (transformação mediada por pêlos); D'Halluin e outros (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505 (eletroporação); Li e outros (1993) *Plant Cell Reports* 12:250-255 e Christou e Ford (1995) *Annals of Botany* 75:407-413 (arroz); Osjoda e outros (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750 (milho através de *Agrobacterium tumefaciens*); todos os quais estão aqui incorporados por

referência. Em modalidades específicas, um ou mais dos polinucleotídeos da invenção, por exemplo, as seqüências dos *loci* marcadores expostas em Id. de Seq. n^{os}: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 e 45, e as seqüências codificadoras expostas em Id. de Seq. n^{os}: 47, 51, 55, 57, 59 e 63, assim como variantes e fragmentos destes, podem ser fornecidos a uma planta usando-se uma variedade de métodos de transformação transitórios. Tais métodos de transformação transitórios incluem, mas não estão limitados à introdução da DGTA de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, a DGAT com teor normal de óleo, permease de aminoácido, PESP, proteína ribossômica e/ou a proteína transportadora ABC da invenção ou variantes e fragmentos destas diretamente na planta ou a introdução na planta de um polinucleotídeo codificando estas respectivas proteínas. Tais métodos incluem por exemplo, microinjeção ou bombardeamento de partículas. Veja, por exemplo, Crossway e outros (1986) *Mol Gen. Genet.* 202:179-185; Nomura e outros (1986) *Plant Sci.* 44:53-58; Hepler e outros (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 2176-2180 e Hush e outros (1994) *The Journal of Cell Science* 107:775-784, todas as quais estão aqui incorporadas por referência. Alternativamente, o polinucleotídeo de interesse, incluindo as seqüências dos *loci* marcadores expostas em Id. de Seq. n^{os}: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 e 45, e as seqüências codificadoras expostas em Id. de Seq. n^{os}: 47, 51, 55, 57, 59 e 63, assim como variantes e fragmentos destes, podem ser transformados de forma transitória na planta usando-se métodos conhecidos na técnica. Tais

técnicas incluem sistema de vetor viral e a precipitação do polinucleotídeo de uma maneira que se evite a liberação subsequente do DNA. Assim, a transcrição do DNA ligado a partícula pode ocorrer, mas a frequência com a qual ele é liberado para se tornar integrado no genoma é reduzida enormemente. Tais métodos incluem o uso de partículas revestidas com polietilimina (PEI; Sigma #P3143).

[176]Em outras modalidades, o polinucleotídeo da invenção podem ser introduzido em plantas através do contato das plantas com um vírus ou ácidos nucléicos virais. Geralmente, tais métodos envolvem incorporar uma construção de nucleotídeo da invenção dentro de uma molécula de DNA ou RNA viral. É reconhecido que um polipeptídeo da invenção, por exemplo, a DGTA de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, a DGAT com teor normal de óleo, permease de aminoácido, PESP, proteína ribossômica e/ou a proteína transportadora ABC da invenção pode ser inicialmente sintetizado como parte de uma poliproteína viral, que pode ser processada depois por proteólise *in vivo* ou *in vitro* para produzir a proteína recombinante desejada. Também, é reconhecido que os promotores da invenção também abrange, promotores utilizados para transcrição por polimerases de RNA viral. Métodos para introduzir polinucleotídeos em plantas e expressar uma proteína codificada nesta, envolvendo moléculas de DNA ou RNA viral, são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Patente U. S. de número 5.889.191, 5.889.190, 5.866.785, 5.589.367 e 5.316.931, e Porta e outros (1996) *Molecular Biotechnology* 5:209-221; aqui incorporados por referência.

[177]Os métodos são conhecidos na técnica para a

inserção objetivada de um polinucleotídeo em uma localização específica no genoma da planta. Em uma modalidade, a inserção do polinucleotídeo em um local genômico desejado é alcançada usando-se um sistema de recombinação sítio-específica. Veja, por exemplo, W099/25821, W099/25854, W099/25840, W099/25855 e W099/25853, todos os quais estão aqui incorporados por referência. Resumidamente, o polinucleotídeo da invenção pode estar contido no cassete de transferência flanqueado por dois sítios de recombinação não recombinogênicos. O cassete de transferência é introduzido em uma planta possuindo estavelmente incorporado em seu genoma um sítio alvo que é flanqueado por dois sítis de recombinação não recombinogênicos que correspondem aos sítios do cassete de transferência. Uma recombinase apropriada é fornecida e o cassete de transferência é integrado no sítio alvo. O polinucleotídeo de interesse é portanto integrado em uma posição cromossomial específica no genoma da planta.

[178]As células que foram transformadas podem ser desenvolvidas em plantas de acordo com formas convencionais. Ver, por exemplo, McCormick e outros, (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Estas plantas podem então ser desenvolvidas, e ou polinizadas com a mesma cepa transformada ou com cepas diferentes, e a prole resultante possuindo expressão constitutiva da característica fenotípica desejada identificada. Duas ou mais gerações podem ser desenvolvidas para assegurar que a expressão da característica fenotípica desejada seja mantida de forma estável e herdada e então as sementes colhidas para assegurar que a expressão da característica fenotípica

desejada foi alcançada. Desta maneira, a presente invenção fornece a semente transformada (também referida como "semente transgência") possuindo um polinucleotídeo da invenção, por exemplo, um cassete de expressão da invenção, estavelmente incorporado em seu genoma.

(F) Plantas e Partes destas Plantas

[179]As composições da invenção também incluem plantas, partes e planta e células de planta possuindo um ou mais dos polinucleotídeos recombinantes da invenção. Nas modalidades específicas, o(s) polinucleotídeo(s) recombinante(s) está(ão) estavelmente integrado(s) no genoma da planta, parte da planta ou célula da planta.

[180]Conforme aqui usado, o termo planta inclui células de planta, protoplastos de planta, culturas de tecido de célula de planta a partir das quais as plantas podem ser regeneradas, calos de planta, molhos de planta e células de planta que estão intactos nas plantas ou partes da planta tais como embriões, (germe) pólen, óvulos, sementes, folhas, flores, ramos, frutos, cernes, espigas, sabugos, cascas, talos, raízes, pontas de raízes, anteras e etc. Grão é objetivado para significar a semente madura produzida por produtores comerciais para propósitos outros que não o desenvolvimento ou reprodução da espécie. A prole, variantes, e mutantes das plantas regeneradas estão também incluídos dentro do escopo da invenção, desde que estas partes compreendam os polinucleotídeos introduzidos.

[181]A presente invenção pode também ser usada para transformação de qualquer espécie de planta, incluindo, mas não limitada a monocotilédones e edicotilédones. Exemplos de espécies de planta de interesse incluem, mas não estão

limitados a milho (*Zea mays*), *Brassica* sp. *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), particularmente aquelas espécies de *Brassica* úteis como fontes de óleo de semente, alfafa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeio (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum vulgare*), milho miúdo ou painço (por exemplo, milho miúdo perolado (*Pennisetum glaucum*), milho miúdo comum/proso (*Panicum miliaceum*), milho painço da Itália (*Setaria italica*), milho miúdo palito (*Eleusine coracana*), girassol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), batata (*Solanum tuberosum*), amendoim (*Arachis hypogaea*), algodão (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), batata doce (*Ipomoea batatas*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea* spp.), coco (*Cocos nucifera*), abacaxi (*Ananas comosus*), árvores cítricas (*Citrus* spp.), cacau (*Theobroma cacao*), chá (*Camellia sinensis*), banana (*Musa* spp.), abacate (*Persea americana*), figo (*Ficus casica*), goiaba (*Psidium guajava*), manga (*Mangifera indica*), oliveira (*Olea europaea*), mamão (*Carica papaya*), caju (*Anacardium occidentale*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*), amêndoa (*Prunus amygdalus*), beterraba (*Beta vulgaris*), cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), aveia, cevada, vegetais, plantas ornamentais, e coníferas.

[182] Os vegetais incluem tomates (*Lycopersicon esculentum*), alface (por exemplo, *Lactuca sativa*), feijão verde (*Phaseolus vulgaris*), feijão de lima (*Phaseolus limensis*), ervilhas (*Lathyrus* spp.), e elementos do gênero *Cucumis* tal como pepino (*C. sativus*), cantaloupe (*C. cantalupensis*), e melão almiscarado (*C. melo*). As plantas ornamentais incluem azaléia (*Rhododendron* spp.), hortênsia

(*Macrophylla hydrangea*), hibiscus (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa spp.*), tulipas (*Tulipa spp.*), narciso (*Narcissus spp.*), petúncias (*Petunia hybrida*), cravo (*Dianthus caryophyllus*), bico-de-papagaio (*Euphorbia pulcherrima*), e crisântemo.

[183]As coníferas que podem ser empregadas na prática da presente invenção incluem, por exemplo, pinheiros tais como pinheiro de incenso (*Pinus taeda*), pitespaine (*Pinus elliotii*), Pinho Ponderosa (*Pinus ponderosa*), Pinus contorta (*Pinus contorta*) e pinho de Monterey (*Pinus radiata*); douglásia (*Pseudotsuga menziesii*); pinheiro do Canadá (*Tsuga canadensis*); epícea-de-Sitka (*Picea glauca*); pinho vermelho (*Sequoia sempervirens*); abetos verdadeiros tal como abeto concolor (*Abies amabilis*) e abeto balsâmico (*Abies balsamea*); e cedros tal como cedro do incenso (*Thuja plicata*) e cedro amarelo do Alaska (*Chamaecyparis nootkatensis*). Em modalidades específicas, as plantas da presente invenção são plantas de cultura (por exemplo, milho, alfafa, girassol, *Brassica*, soja, algodão, cártamo, amendoim, sorgo, trigo, milho miúdo, tabaco, e etc). Em outras modalidades, os pés de milho e soja são ideais, e ainda em outras modalidades os pés de milho são ideais.

[184]Outras plantas de interesse incluem plantas em grão que fornecem sementes de interesse, plantas de semente oleaginosa, e plantas leguminosas. Sementes de interesse incluem sementes de cereais, tais como milho, trigo, cevada, arroz, sorgo, centeio, etc. As plantas de semente oleaginosa incluem algodão, soja, cártamo, brássica, milho, palma, coco, etc. As plantas leguminosas incluem feijões e ervilhas. Os feijões incluem guar, semente de alfarroba ,

feno-grego, soja, fejoeiro-de-trepar, grão-de-bico, feijão mungo, feijão-de-lima, fava, lentilhas, grão-de-bico, etc.

[185]Em algumas modalidades, as plantas da invenção compreendem um polinucleotídeo heterólogo que é geneticamente ligado à região de QTL6 aqui identificada e que confere o traço fenotípico de proporção de alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico e/ou teor de ácido oléico/ácido linoléico aumentado a uma planta ou parte de planta. Desta maneira, as plantas de invenção podem compreender, incorporadas de maneira estável em seu genoma, um polinucleotídeo heterólogo compreendendo pelo menos uma sequência associada a alto teor de óleo ou pelo menos uma sequência associada a alto teor ácido oléico, ligada de forma operável a um promotor ativo na planta ou parte de planta, onde a sequência associada a alta oleosidade ou sequência de alto ácido oléico é derivada de uma sequência de nucleotídeo genômico geneticamente ligada a pelo menos um *locus* marcador favorável que esteja associado a conteúdo de alto teor de óleo ou alto teor de ácido oléico, onde o *locus* marcador seja selecionado a partir do grupo consistindo da Id. de Seq. nº: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, e 51 com pelo menos um polimorfismo na mesma. A expressão do polinucleotídeo heterólogo compreendendo a sequência associada a alto teor de óleo ou a sequência associada a alto teor de ácido oléico aumenta o conteúdo de óleo ou conteúdo de ácido oléico na planta ou parte de planta. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo heterólogo compreende pelo menos uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo das sequências expostas nas Id. de Seq.

nº: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, e 47, ou uma variante ou fragmento destas compreendendo pelo menos um dos polimorfismos identificados nestas respectivas seqüências, onde a expressão do polinucleotídeo heterólogo de interesse aumenta o conteúdo de óleo e/ou conteúdo de ácido oléico na planta ou parte de planta.

[186]Em outras modalidades, as plantas compreendem uma construção de expressão compreendendo um polinucleotídeo codificando o polipeptídeo de DGAT de óleo normal da invenção (por exemplo, ZmDGAT12-2(EF09B), ou uma variante biologicamente ativa ou fragmento da mesma, ligada de forma operável a um promotor que é funcional em uma célula de planta. Esta construção de expressão oferece uma superexpressão do polipeptídeo DGAT de teor de óleo normal, ou um fragmento ativo ou variante deste. Como o DGAT de teor de óleo normal está envolvido na biossíntese de óleo, a superexpressão desta proteína ou superexpressão de um variante biologicamente ativa ou fragmento deste em uma planta ou parte de planta pode levar a um aumento no conteúdo de óleo, conteúdo de ácido oléico e/ou proporção ácido oléico/ácido linoléico na planta ou parte de planta. Ver, por exemplo, os métodos descritos no Exemplo 11 abaixo.

[187]Em certas modalidades, os polinucleotídeos da presente invenção podem ser empilhados em qualquer combinação das seqüências de polinucleotídeo de interesse a fim de criar plantas com um traço desejado. Um traço, conforme aqui utilizado, refere-se ao fenótipo derivado de uma seqüência em particular ou grupos de seqüências. Por

exemplo, um ou mais nucleotídeos da presente invenção que conferem o fenótipo de alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico, podem ser empilhados com quaisquer outros polinucleotídeos codificando polipeptídeos possuindo atividade pesticida e/ou inseticida, como outras proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* (descritas nas Patentes U. S. de número 5.366.892; 5.747.450; 5.737.514; 5.723.756; 5.593.881; e Geiser e outros (1986) *Gene* 48:109), lecitinas (Van Damme e outros (1994) *Plant Mol. Biol.* 24:825), pentina (descrita na Patente U. S. de número 5.981.722) e similares. As combinações geradas podem também incluir múltiplas cópias de qualquer um dos polinucleotídeo de interesse. Os polinucleotídeos da presente invenção podem ser também empilhados com qualquer outro gene ou combinação de genes para produzir plantas com uma variedade de combinações de traços desejados incluindo, mas não limitados a, traços desejáveis para farinha para animais, como genes de alto teor de óleo (por exemplo, Patente U. S. de número 6.232.529) ou genes que estejam envolvidos na biossíntese de óleo, incluindo o DGAT de óleo normal aqui descrito (por exemplo, ZmDGAT1-2(EF09B); aminoácidos balanceados (por exemplo, hordotioninas (Patentes U. S. de número 5.990.389; 5.885.801; 5.885.802 e 5.703.409); alto teor de lisina em cevada (Williamson e outros (1987) *Eur. J. Biochem.* 165:99-106; e WO 98/20122) e proteínas de alto teor de metionina (Pedersen e outros (1986) *J. Biol. Chem.* 261:6279; Kirihara e outros (1988) *Gene* 71:359; e Musumura e outros (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:123)); digestinilidade aumentada (por exemplo, proteínas de armazenamento modificadas (Pedido de Patente U.S. de número de série

10/053.410, depositado em 7 de novembro de 2001); e tioredoxinas (Pedido de Patente U.S. de número de série 10/005.429, depositado em 3 de dezembro de 2001); as divulgações dos quais estão aqui incorporados por referência.

[188] Os polinucleotídeos da presente invenção podem ser também empilhados com traços desejáveis para resistência a doenças e a herbicidas (por exemplo, genes de desintoxicação de fumonisina (Patente U. S. de número 5.792.931); genes de resistência a virulência e doenças (Jones e outros (1994) *Science*, 266:789; Martin e outros (1993) *Science*, 262:1432; Martin e outros (1984) *Cell* 78:1089); mutantes de acetolactato sintase (ALS) que levam a resistência a herbicidas como mutações do S4 e/ou Hra; inibidores de glutamina sintase como fosfinotricina ou basta (por exemplo, gene bar); e resistência a glifosato (gene EPSPS)); e traços desejáveis para o processamento ou processo de produtos como alto teor de óleo (por exemplo, Patente U. S. de número 6.232.529); óleos modificados (por exemplo, genes de ácido graxo dessaturado (Patente U. S. de número 5.952.544; WO 94/11516)); amidos modificados (por exemplo, ADPG pirofosforilases (AGPase), amido sintase (SS), enzimas ramificantes de amido (SBE) e enzimas desramificantes de amido (SDBE)); e polímeros ou bioplásticos (por exemplo, Patente U. S. de número 5.602.321; beta-cetotiolase, polihidroxitirato sintase e acetoacetil-CoA sintase (Schubert e outros (1988) *J. Bacteriol.* 170:5837-5847) facilitar a expressão de polihidroxiálcanoatos (PHAs)); a divulgação das quais está aqui incorporada por referência. Pode-se ainda combinar os

polinucleotídeos da presente invenção com os polinucleotídeos fornecendo traços agronômicos como esterilidade de machos (por exemplo, ver Patente U. S. de número 5.583.210), resistência de caule, tempo de floração, ou traços de tecnologia de transformação como regulação de ciclo celular ou recombinação genética (por exemplo, WO 99/61619, WO 00/17364 e WO 99/25821); a divulgação das quais está aqui incorporada por referência.

[189]Estas combinações empilhadas podem ser criadas por qualquer método, incluindo, mas não limitado a, plantas hidribizadas por qualquer metodologia convencional ou TopCross, ou transformação genética. Se as seqüências estão empilhadas por transformação genética das plantas, as seqüências de polinucleotídeo de interesse podem ser combinadas a qualquer momento e em qualquer ordem. Por exemplo, uma planta transgênica compreendendo um ou mais traços desejado pode ser utilizadas como alvo para introdução de traços adicionais por transformação subsequente. Os traços podem ser introduzidos simultaneamente em um protocolo de co-transformação com os polinucleotídeos de interesse fornecidos por qualquer combinação de cassete de transformação. Por exemplo, se duas seqüências serão introduzidas, as duas seqüências podem estar contidas em cassetes de transformação separados (trans) ou contidas no mesmo cassete de transformação (cis). A expressão destas seqüências pode ser induzida pelo mesmo promotor ou por promotores diferentes. Em certos casos, pode ser desejável introduzir um cassete de transformação que irá suprimir a expressão de outro polinucleotídeo de interesse. Isto pode ser combinado com

qualquer combinação de outros cassetes de supressão ou cassetes de superexpressão para gerar a combinação desejada de traços na planta. É adicionalmente reconhecido que seqüências de polinucleotídeo podem ser empilhadas em uma localização genômica desejada utilizando-se um sistema de recombinação de sítio específico. Ver, por exemplo, WO 99/25821, WO 99/25854, WO 99/25840, WO 99/25855, e WO 99/25853, a totalidades das quais está incorporada por referência.

[190] Em tal modalidade, um ou mais polinucleotídeos associados a alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico da invenção (por exemplo, ZmDGAT1-2 (ASK) da Id. de Seq. nº:47), ou um polinucleotídeo DGAT de teor de óleo normal da invenção (por exemplo, ZmDGAT1-2(EF09B) da Id. de Seq. nº:51), ou qualquer combinação da mesma, são empilhados com um polinucleotídeo heterólogo codificando um ativador do tipo transcricional *Cotilédone folhoso 1* (LEC1) de domínio B ou uma variante biologicamente ativa ou fragmento desta, que fornece a modulação adicional do nível de óleo em uma planta. O ativador transcricional *Cotilédone folhoso 1* (LEC1) é um membro da família do ativador de transcrição HAP (proteína ativada por heme) 3, cujos membros são caracterizados como possuindo três regiões: Os domínios A, B e C. O domínio B central é conservado entre os membros da família e compreende motivo de ligação de caixa CCAAT de ligação de DNA conservado. A Figura 33 fornece um alinhamento de seqüência de vários membros da família do ativador transcricional HAP3 e marca as posições de domínio A, B e C e ainda mostra a caixa CCAAT conservada. Com base na identidade de seqüência e função,

os membros da família HAP3 foram divididos em duas classes: membros possuindo o tipo LEC1 de domínio B e membros possuindo um tipo não LEC1 de domínio B. A superexpressão de um polipeptídeo compreendendo um tipo LEC1 de domínio B em uma planta ou parte de planta do mesmo aumenta de forma benéfica a produção de óleo em uma planta ou parte de planta deste. Ver, por exemplo, a Publicação de Pedido de Patente U.S. de número 20050160494, aqui incorporada por referência.

[191]Os domínios B de vários membros da família de ativador transcricional HAP3 estão alinhados na Figura 34. O domínio B para o LEC1 *Arabidopsis*, do resíduo de aminoácido 28 ao resíduo 117, compartilham entre 55% e 63% de identidade (75% a 85% de similaridade) com outros membros da família HAP3, incluindo milho (HAP3), frango, lampreia, *Xenopus*, humano, camundongo, *Emericella nidulens*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluuyveromyces lactis* (Lotan e outros (1998) *Cell* 93: 1193-1205). As seqüências superiores, levemente sombreadas são membros representativos do tipo LEC1 de domínio B, enquanto as seqüências inferiores, fortemente sombreadas, são representativas dos membros do domínio de tipo não LEC1.

[192]Geralmente, o tipo LEC1 de domínio B compreende 16 resíduos conservados que diferem dos resíduos conservados em posições equivalentes nos domínios B do tipo não LEC1 (Lee e outros (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:2152-2156, aqui incorporado por referência em sua totalidade). Estes resíduos residem em um motivo do domínio B do tipo LEC1 que é representado pela seqüência de consenso exposta na Id. de Seq. n° 49. É reconhecido,

entretanto, que os 16 resíduos conservados expostos na sequência de consenso para este motivo de um domínio B de tipo LEC1 podem ser alterados o polipeptídeo LEC1 ainda mantém atividade LEC1. Ver, por exemplo, Lee e outros, (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:2152-2156, aqui incorporado por referência em sua totalidade, o qual demonstra alterações específicas em alguns dos resíduos conservados continuam a permitir que o polipeptídeo mantenha a atividade LEC1. Descobriu-se que o aminoácido D28 da Id. de Seq. nº 49 desempenha um importante papel na preservação da atividade LEC1. Em uma modalidade, o domínio B de tipo LEC1 compreende o domínio B de tipo LEC1 exposto nos resíduos 36 a 126 da Id. de Seq. nº 51, que expõe o polipeptídeo LEC1 de milho. O domínio B do tipo LEC1 do polipeptídeo LEC1 do milho é codificado pelos nucleotídeos 106 a 378 da Id. de Seq. nº 50, que expõe a sequência de codificação para o polipeptídeo LEC1 do milho. Vários polinucleotídeo e polipeptídeo possuindo domínio B do tipo LEC1 são expostos nas Publicações dos Pedidos de Patente U. S. de número 20030126638 e 20030204870, as quais estão aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

[193]Conforme descrito em detalhes em outro local deste, variantes biologicamente ativas e fragmentos do domínio B de tipo LEC1 podem ser também empregados nos métodos da invenção direcionados ao empilhamento de um ou mais dos polinucleotídeos associados ao alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico da presente invenção, um polinucleotídeo DGAT de teor de óleo normal da invenção, ou qualquer combinação destes, com um polinucleotídeo heterólogo codificando um domínio B do tipo LEC1, assim

conferindo um fenótipo de alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico e/ou proporção aumentada de ácido oléico/ácido linoléico em uma planta ou parte de planta deste. Tais variantes e fragmentos são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, a Figura 34 e também Lee e outros, (2003) *PNAS* 2152-2156 e Publicação de Pedido de Patente U. S. de número 20050034193.

[194] Fragmentos biologicamente ativos e variantes de um domínio B do tipo LEC1 continuarão a sustentar atividade LEC1 quando o domínio for colocado no contexto de um domínio funcional A e/ou funcional C de um ativador transcricional HAP3. Conforme aqui utilizado, "atividade LEC1" é definida como a capacidade de um polipeptídeo em melhorar a síntese de lipídios como refletido em produção de óleo aumentada.

[195] Em uma modalidade, o polinucleotídeo ou polipeptídeo LEC1 empregado na invenção compreende o polinucleotídeo e polipeptídeo exposto na Id. de Seq. nº 50 e Id. de Seq. nº 51, respectivamente. Conforme descrito em detalhes em outro local deste, variantes biologicamente ativas e fragmentos do polinucleotídeo e polipeptídeos LEC1 podem também ser empregadas nos métodos da invenção. Tais variantes e fragmentos são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, as Figuras 33 e 34 e também Lee e outros, (2003) *PNAS* 2152-2156; Kwong e outros, (2003) *The Plant Cell* 15:5-18; Publicação de Pedido de Patente U. S. de número 20030126638; WO 02/57439, Patente U. S. de número 6.825.397; Patente U. S. de número 6.781.035; Publicação de Pedido de Patente U. S. de número 20050034193; e WO 98/37184.

[196]Conforme aqui utilizado, um "ativador transcricional HAP3" compreende um membro da família HAP3. Esta família de ativadores transcricionais é estruturalmente bem caracterizada. Ver Li e outros, (1992) *Nucleic Acid Research* 20:1087-1091; Xing e outros, (1993) *EMBO J.* 12:4647-4655; Kim e outros (1996) *Mol Cell Biol.* 16:4003-4013; Sinha e outros (1996) *Mol Cell Biol* 16:328-337; e, Lotan e outros (1998) *Cell* 93:1195-1205, cada um dos quais está aqui incorporado por referência. Nos métodos e composições da invenção, o ativador transcricional HAP3 compreende um domínio B do tipo LEC1. Conseqüentemente, um ativador transcricional HAP3 empregado na presente invenção pode compreender um polipeptídeo quimérico possuindo um domínio funcional A e/ou funcional B do ativador transcricional HAP3 o que, em sua forma nativa, pode ou não possuir um domínio B do tipo LEC1. Ver, por exemplo, Lee e outros, (2003) *PNAS* 2152-2156.

[197]EM uma modalidade, um polinucleotídeo heterólogo codificando uma variante de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico de DGAT, por exemplo, o polipeptídeo ZmDAGT1-2(ASK) ou variante ou fragmento biologicamente ativo do mesmo conferindo o fenótipo de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico é empilhado com um polinucleotídeo heterólogo codificando um polipeptídeo compreendendo um domínio B do tipo LEC1 possuindo uma seqüência de aminoácido exposta na Id. de Seq. nº 65 ou uma variante biologicamente ativa ou fragmento da Id. de Seq. nº 65, onde a variante biologicamente ativa compreende pelo menos 80% de identidade de seqüência com Id. de Seq. nº 65, onde o polipeptídeo ou a variante biologicamente ativa ou

fragmento do mesmo possui atividade LEC1. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo heterólogo codificando a variante de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico de DGAT compreende a seqüência de polinucleotídeo exposta na Id. de Seq. nº 47 ou variante ou fragmento desta e o polinucleotídeo codificando o domínio B do tipo LEC1 compreende a seqüência de polinucleotídeo exposta na Id. de Seq. nº 66 ou uma variante ou fragmento desta.

[198]Em ainda outra modalidade, um polinucleotídeo heterólogo codificando um DGAT de teor de óleo normal, por exemplo, o polipeptídeo ZmDAGT1-2(EF09B) ou variante ou fragmento biologicamente ativo do mesmo capaz de aumentar o conteúdo de óleo e/ou conteúdo de ácido oléico quando superexpresso em uma planta ou parte de planta deste, é empilhado com um polinucleotídeo heterólogo codificando um polipeptídeo compreendendo um domínio B do tipo LEC1 possuindo uma seqüência de aminoácido exposta na Id. de Seq. nº 65 ou uma variante biologicamente ativa ou fragmento da Id. de Seq. nº 65, onde a variante biologicamente ativa compreende pelo menos 80% de identidade de seqüência com Id. de Seq. nº 65, onde o polipeptídeo ou a variante biologicamente ativa ou fragmento do mesmo possui atividade LEC1. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo heterólogo codificando o DGAT de teor de óleo normal compreende a seqüência de polinucleotídeo exposta na Id. de Seq. nº 51 ou variante ou fragmento desta e o polinucleotídeo codificando o domínio B do tipo LEC1 compreende a seqüência de polinucleotídeo exposta na Id. de Seq. nº 66 ou uma variante ou fragmento desta.

[199]É reconhecido que onde um ou mais polinucleotídeos da invenção são empilhados com um polinucleotídeo heterólogo codificando um polipeptídeo compreendendo um domínio B do tipo LEC1, estas seqüências podem ser também empilhadas com um ou mais polinucleotídeos que proporcionem a inibição de expressão ou função de um produto de gene que está envolvido em biossíntese de amido, desta forma melhorando adicionalmente a produção de óleo e alterações na qualidade do óleo. Desta maneira, uma redução na síntese de amido pode ser atingida através de expressão reduzida de genes que codificam proteínas que normalmente servem como proteínas de nucleação de amido, catalisadores enzimáticos ou assimilam transportadores envolvidos na biossíntese de amido. Qualquer um dos mecanismos conhecidos na técnica para efetuar a inibição de expressão genética pode ser utilizado para interferir de maneira ideal com os genes de biossíntese de amido incluindo, mas não limitado a, genes codificando sacarose sintase, hexocinase(s), fosfoglucomutase, fosfoglucoisomerase, ADP-glucose pirofosforilase (AGP), amilogenina (um iniciador de proteína da biogênese de amido), amido sintase solúvel e ligada e enzimas de ramificação de amido, enzimas de desramificação de amido, enzimas de isoamilase, amido fosforilases e a proteína de transporte Brittle-1. Ver, por exemplo, a Publicação de Pedido de Patente U.S. de número 20050160494, intitulada *"Alteration of Oil Traits in Plants"*, aqui incorporada por referência em sua totalidade.

[200]Em outras modalidades, um ou mais nucleotídeos associados a alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico da

invenção, ou um polinucleotídeo DGAT de teor de óleo normal da invenção (por exemplo, ZmDGAT1-2(EF09B) da Id. de Seq. nº 51), ou qualquer combinação destes, são empilhados com um polinucleotídeo heterólogo que possibilita a alteração da qualidade do teor de óleo aumentado produzido na planta alterando a expressão ou funcionamento das proteínas ou enzimas que estão envolvidas em modificação lipídica. Exemplos de proteínas e enzimas que modificam as características do óleo no interior das plantas incluem, mas não estão limitados a, qualquer um dos dessaturados de ácido graxo, por exemplo, proteína transportadora de estearoil-acil dessaturase (Fad1; ver Patente U. S. de número 6.117.677), delta-15 dessaturase (omega-3) (Fad3; ver Shah e outros, (1997) *Plant Physiol.* 114:1533-1539), delta-4 (trans) dessaturase (Fad4; Xiao e outros, (2001) *J. Biol. Chem.* 276:31561-31566), delta-7 dessaturase (Fad5; ver Patente U. S. de número 6.635.451), ácido graxo omega-6 dessaturase (Fad6; ver Patente U. S. de número 6.635.451), ácido graxo Omega-3 dessaturase (Fad7; Iba e outros, (1993) *Biol. Chem.* 268:24099-24105), delta-5 dessaturase (ver Patente U. S. de número 6.589.767), delta-9 dessaturase (ver Patente U. S. de número 5.723.595), acil-CoA graxo:álcool graxo aciltransferase (cera sintase; ver Patente U. S. de número 6.492.509), beta-cetoacetil-ACP sintase em uma orientação de senso ou antisenso (ver Patente U. S. de número 6.483.008), e ácido graxo delta-12 dessaturase (FAD2), uma enzima que converte ácido oléico em ácido linoléico introduzindo uma ligação dupla na posição delta-12 (Okuley e outros, (1994) *Plant Cell* 6:147-58).

[201]Exemplos de FAD2 e seqüências de codificação

correspondentes são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Acesso GenBank de número NM_112047; Acesso GenBank de número AF243045; Patente Européia de número EP 0668919 B1; Patente U. S. de número 6.291.742; Patente U. S. de número 6.310.194; Patente U. S. de número 6.323.392; Patente U. S. de número 6.372.965; Publicação de Pedido de Patente U. S. de número 20030033633; e Publicação de Pedido de Patente U. S. de número 20030140372; todas as quais estão aqui incorporadas em sua totalidade por referência. Foram identificadas proteínas FAD2 em milho. Uma destas proteínas FAD2 é denominada ZmFAD2-1 (seqüência de nucleotídeo exposta em Id. de Seq. n° 131, seqüência de aminoácido exposta na Id. de Seq. n° 132) e a outra é denominada ZmFAD2-2 (Kinney e outros, (2001) *Biochem. Soc. Trans.* 30:1099-1103; e Mikkilineni e outros, (2003) *Theor. Appl. Genet.* 106:1326-1332). A supressão ou remoção de ambos os genes aumenta a concentração de ácido oléico relativa em 75%.

[202]Assim, ao interferir com a atividade de ácido graxo dessaturase, por exemplo, inibindo a expressão ou funcionamento de FAD2, a conversão de ácido oléico em ácido linoléico pode ser evitada e, assim, o ácido oléico se acumula na planta ou parte de planta deste como sementes, incluindo embriões de semente.

[203]Em algumas modalidades, um ou mais polinucleotídeos associados a alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico da invenção, ou um polinucleotídeo DGAT de teor de óleo normal da invenção (por exemplo, ZmDGAT1-2(EF09B) da Id. de Seq. n° 51), ou qualquer combinação destes, são empilhados em um fundo de germoplasma de planta

que possui um alelo favorável para FAD2 que normalmente confere um fenótipo de alto teor de [ácido oléico àquela planta. Por "fenótipo de alto teor de ácido oléico" no contexto de um alelo favorável para FAD2, se intenciona que a planta ou parte de planta desta, por exemplo, a semente ou embrião, possua uma concentração de ácido oléico de cerca de 30% ou superior. Assim, por exemplo, em milho, linhas convencionais que não possuem um alelo FAD2 favorável possuem uma concentração de ácido oléico em semente ou embrião de cerca de 25% ou menos. Ver, por exemplo, a concentração de ácido oléico em embrião da linha consanguínea de milho de teor de óleo normal, EF09B, na Figura 4. Tal empilhamento pode ser conseguido introduzindo-se os polinucleotídeos associados a alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico da invenção (por exemplo, ZmDGAT1-2 (ASK) da Id. de Seq. nº 47), ou o polinucleotídeo DGAT de teor de óleo normal da invenção (por exemplo, ZmDGAT1-2 (EF09B) da Id. de Seq. nº 51) ou qualquer combinação destes, neste fundo de germoplasma favorável, ou através de métodos de transformação ou através de métodos de reprodução conhecidos na técnica e descritos aqui em outro local. Ver, por exemplo, os métodos descritos no Exemplo 14 aqui abaixo.

[204]Em outras modalidades, um ou mais polinucleotídeos associados a alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico da invenção (por exemplo, ZmDGAT1-2 (ASK) da Id. de Seq. nº:47), ou um polinucleotídeo DGAT de teor de óleo normal da invenção (por exemplo, ZmDGAT1-2(EF09B) da Id. de Seq. nº:51), ou qualquer combinação da mesma, são empilhados com um polinucleotídeo heterólogo que

compreende uma sequência inibidora de FAD2 projetada para silenciar a expressão de um FAD2. Métodos para silenciar a expressão de FAD2 são descritos na Publicação do Pedido de Patente U. S. de número 20050160494 e WO 2005/063988, aqui incorporadas por referência em sua totalidade. Suprimindo-se a expressão ou função de um FAD2, aumentos adicionais do conteúdo de ácido oléico e/ou da proporção de ácido oléico / ácido linoléico podem ser alcançados além daqueles conferidos pela expressão dos polinucleotídeos associados a alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico da invenção, ou superexpressão do polinucleotídeo DGAT de teor de óleo normal da invenção.

[205] Uma "sequência inibidora de FAD2" refere-se a uma sequência inibidora que é capaz de inibir a expressão de um FAD2 (por exemplo, uma sequência inibidora de FAD2 objetivando ZmFAD2-1), no nível de transcrição e/ou tradução, ou que seja capaz de inibir a função de um FAD2. Quando a frase "capaz de inibir" é utilizada no contexto de uma sequência inibidora de polinucleotídeo, pretende-se significar que a sequência inibidora em si exerce o efeito inibidor; ou, onde a sequência inibidora codifica uma molécula de nucleotídeo inibidora (por exemplo, um RNA "grampo de cabelo", miRNA, ou polinucleotídeos de RNA de filamento duplo), ou codifica um polipeptídeo inibidor (isto é, um polipeptídeo que inibe a expressão ou função do produto de gene alvo), após sua transcrição (por exemplo, no caso de uma sequência inibidora codificando um RNA "grampo de cabelo", miRNA ou polinucleotídeo de RNA de filamento duplo) ou sua transcrição e tradução (no caso de uma sequência inibidora codificando um polipeptídeo

inibidor), o produto transcrito ou traduzido, respectivamente, exerce o efeito inibidor no produto de gene alvo (isto é, inibe a expressão ou função do produto de gene alvo).

[206]Qualquer sequência de nucleotídeo codificando um FAD2 conhecido na técnica pode ser utilizado nos métodos da invenção que utilize uma abordagem transgênica para empilhar os polinucleotídeos associados ao alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico da invenção, ou o DGAT1-2 de teor normal de óleo da invenção, ou qualquer combinação destes, com um polinucleotídeo heterólogo que seja projetado para inibir a expressão ou função de um FAD2. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo heterólogo compreende uma sequência de nucleotídeo FAD2, como ZmFAD2-1 (Id. de Seq. nº 131), uma sequência de nucleotídeo codificando ZmFAD2-1 da Id. de Seq. nº 132, uma sequência de nucleotídeo ZmFAD2-2, combinações de ambas, ou similares. Ver, por exemplo, as sequências divulgadas em Mikkilineni e outros, (2003) *Theor. Appl. Genet.* 106:1326-1332. Em algumas modalidades, a sequência de FAD2 é selecionada entre, mas não limitada a, aquelas divulgadas na Acesso GenBank de número NM_112047, Acesso GenBank de número AF243045, Patente U. S. de número 6.323.392, Patente U. S. de número 6.372.965, Publicação do Pedido de Patente U. S. de número 20030033633, e Publicação do Pedido de Patente U. S. de número 20030140372, todas as quais estão aqui incorporadas em sua totalidade por referência. Em outras modalidades, o polinucleotídeo heterólogo compreende regiões truncadas da sequência do nucleotídeo ZmFAD2, por exemplo, ZmFAD2-1 da Id. de Seq. nº 131, na orientação

senso e orientação antisenso; ver, por exemplo, Id. de Seq. nº 133.

[207] Por exemplo, em algumas modalidades, o polinucleotídeo heterólogo compreende uma sequência inibidora de FAD2 que é expressa na orientação senso. Em algumas modalidades, as transcrições em orientação senso provocam co-supressão. Em outras modalidades, a expressão de orientação senso de transcrições de FAD2 trincadas provocam proteínas não funcionais a serem expressas e desta forma inibem a atividade FAD2. Alternativamente, a sequência ou sequências inibidora(s) de FAD2 podem ser expressas na orientação antisenso e desta forma inibir a expressão ou atividade de FAD2 endógeno por mecanismos antisenso.

[208] Ainda em outras modalidades, a sequência ou sequências inibidora(s) no polinucleotídeo heterólogo são expressas como RNA "grampo de cabelo", que possui tanto componente de sequência senso quanto antisenso. Em modalidades compreendendo uma estrutura de "grampo de cabelo", a estrutura de laço pode compreender qualquer sequência de nucleotídeo adequada, incluindo, por exemplo, regiões não traduzidas 5' do gene a ser suprimido, como o 5' UTR de FAD2, sequências de nucleotídeo de íntron de álcool desidrogenase (*adh1*), nucleotídeos aleatórios, espaçadores de polinucleotídeo e similares (ver também Baileu-Serres e Dawe (1996) *Plant Physiol.* 112:685). Em algumas modalidades, a sequência ou sequências inibidora(s) de FAD2 ou expressas como um "grampo de cabelo" são codificadas por uma região invertida de sequências de nucleotídeo codificando FAD2, como a sequência de

nucleotídeo ZmFAD2-1 (Id. de Seq. nº 131), a sequência de nucleotídeo ZmFAD2-2, ou uma combinação destas. Ainda em outras modalidades, as sequências inibidoras são expressas como RNA de duplo filamento, onde uma sequência de FAD2 inibidora é expressa na orientação senso e outra sequência complementar é expressa na orientação antisenso. Ver, por exemplo, a sequência de polinucleotídeo inibidora de FAD2 exposta na Id. de Seq. nº 133. RNA de duplo filamento, estruturas de "grampo de cabelo" e combinações destas compreendendo sequências FAD2 podem operar por interferência de RNA, co-supressão, mecanismo de antisense e combinação destes, ou por meio de outro mecanismo que provoque a inibição da expressão ou função de FAD2.

[209]Em outras modalidades, um ou mais polinucleotídeos associados a alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico da invenção são empilhados com um polinucleotídeo heterólogo codificando um polipeptídeo envolvido na alteração de traços de óleo em plantas, onde o polipeptídeo é aquele divulgado na Publicação de Pedido de Patente U. S. de número 20030204870, intitulado "*Alteration of Oil Traits in Plants*", aqui incorporada por referência em sua totalidade. Em tal modalidade, o polinucleotídeo codifica um aintegumenta tipo 2 CKC (Id. de Seq. nº 320 da Publicação de Pedido de Patente U. S. de número 20030204870, codificando a sequência da Id. de Seq. nº 319 desta publicação de pedido de patente), que fornece a modulação adicional do nível de óleo em uma planta.

[210]Em outras modalidades da invenção, um ou mais polinucleotídeos associados ao alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico da invenção são empilhados com uma

base genética "TUSC27". As plantas compreendendo a base genética TUSC27 compreendem um alelo de inserção TUSC Mu hereditário no gene gama-zein 27 kD que contribui para melhorar a qualidade do grão, particularmente capacidade de digestão melhorada do grão. Ver, por exemplo, a Publicação do Pedido de Patente U.S. de número 20050204418, intitulada "*Grain Quality through Altered Expression of Seed Proteins*", aqui incorporada por referência em sua totalidade.

III. Métodos:

(A) Modulação do nível de uma Sequência da Invenção

[211]A introdução e expressão de um ou mais dos polinucleotídeos associados a alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico da invenção, ou um polinucleotídeo DGAT de teor de óleo normal da invenção, em uma planta permite um aumento no nível da sequência de polinucleotídeo respectiva de interesse, e onde a sequência compreende sequência de codificação, permite um aumento no nível do polipeptídeo codificado, por exemplo, uma variante de DGAT com alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico, um DGAT de teor normal de óleo, um AAP1, um PESP, uma proteína S24 ribossômica 40S, e/ou uma proteína de transporte ABC. Um "nível modulado" ou "nível de modulação" de um polinucleotídeo ou um polipeptídeo no contexto dos métodos da presente invenção refere-se a qualquer aumento na expressão, concentração e/ou atividade de um produto de gene (isto é, polipeptídeo ou polinucleotídeo), incluindo qualquer incremento relativo na expressão, concentração e/ou atividade. O termo "expressão" conforme aqui utilizado no contexto de um produto de gene, refere-se à biossíntese

daquele produto incluindo a transcrição e tradução do produto de gene. Em geral, o nível do polipeptídeo ou polinucleotídeo é aumentado em pelo menos 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 120%, ou mais em relação à planta, parte de planta ou célula de controle nativa. A modulação na presente invenção pode ocorrer durante e/ou subsequente ao desenvolvimento da planta ao estágio desejado de desenvolvimento. Em modalidades específicas, os polinucleotídeos ou os polipeptídeos da presente invenção são modulados em monocotilédones, particularmente milho.

[212]O nível de expressão de uma variante de DGAT de alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico, um DGAT de teor normal de óleo, um AAP1, um PESP, uma proteína S24 ribossômica 40S e/ou uma proteína transportadora ABC do polipeptídeo da invenção pode ser medido diretamente, por exemplo, realizando-se um ensaio para o nível do polipeptídeo respectivo na planta, ou indiretamente, por exemplo, medindo-se a atividade do respectivo polipeptídeo na planta. Métodos para determinar se a expressão de uma variante de DGAT de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, um AAP1, um PESP, uma proteína S24 ribossômica 40S, e/ou uma proteína de transporte ABC ou variante biologicamente ativa ou fragmento desta, confere ao fenótipo de alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico e/ou ácido oléico/ácido linoléico aumentados em uma planta ou parte de planta deste são conhecidos na técnica e são descritos em outro local deste. De forma similar, métodos para determinar se a superexpressão de um DGAT de teor normal de óleo da invenção, ou variante biologicamente ativa ou fragmento desta, são bem conhecidos na técnica e

são descritos em outro local deste.

[213]Em modalidades específicas, o polipeptídeo ou o polinucleotídeo da invenção é introduzido na célula vegetal. Subseqüentemente, uma célula vegetal possuindo a seqüência da invenção introduzida é selecionada utilizando-se métodos conhecidos àqueles habilitados na técnica como, mas não limitado a, análise de Southern blot, sequenciamento de DNA, análise de PCR ou análise fenotípica. Uma planta ou parte de planta alterada ou modificada pelas modalidades precedentes é desenvolvida sob condições formação de planta por um período suficiente para modular a concentração e/ou a composição de polipeptídeos da presente invenção na planta. As condições de formação de planta são bem conhecidas na técnica e discutidas de forma breve em outro local deste.

[214]É também reconhecido que o nível e/ou atividade do polipeptídeo pode ser modulado empregado-se um polinucleotídeo que não seja capaz de direcionar, em uma planta transformada, a expressão de uma proteína ou um RNA. Por exemplo, os polinucleotídeos da invenção podem ser utilizados para projetar construções de polinucleotídeo que possam ser empregadas em métodos para alterar ou causar mutação em uma seqüência de nucleotídeo genômico em um organismo. Algumas construções de polinucleotídeos incluem, mas não estão limitadas a, vetores RNA:DNA, vetores mutacionais RNA:DNA, vetores de reparo RNA:DNA, oligonucleotídeos duplos misturados, oligonucleotídeos de RNA:DNA autocomplementar, e oligonucleobases recombinogênicas. Tais construções de nucleotídeo e métodos para utilização são conhecidos na técnica. Ver,

Patentes U. S. de número 5.565.350; 5.731.181; 5.756.325; 5.760.012; 5.795.972; e 5.871.984; todas as quais estão aqui incorporadas por referência. Ver também, WO 98/49350, WO 99/07865, WO 99/25821 e Beetham e outros (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8774-8778, aqui incorporadas para referência.

[215]É desta forma reconhecido que os métodos da presente invenção não dependem da incorporação do polinucleotídeo completo dentro do genoma, apenas que a planta ou célula desta seja alterada como um resultado da introdução do polinucleotídeo em uma célula. Em uma modalidade da invenção, o genoma pode ser alterado seguindo a introdução do polinucleotídeo em uma célula. Por exemplo, o polinucleotídeo, ou qualquer parte deste, pode incorporar-se ao genoma da planta. Alterações ao genoma da presente invenção incluem, mas não estão limitadas a adições, exclusões, e substituições de nucleotídeos no genoma. Embora os métodos da presente invenção não dependam de adições, exclusões e de substituições de qualquer número particular de nucleotídeos, é reconhecido que tais adições, exclusões, ou substituições compreendem pelo menos um nucleotídeo.

[216]Em uma modalidade, a atividade e/ou nível de uma variante de DGAT de alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico, um DGAT de teor normal de óleo, um AAP1, um PESP, uma proteína S24 ribossômica 40S e/ou uma proteína transportadora ABC da invenção é aumentada(o). Um aumento no nível e/ou atividade do respectivo polipeptídeo da invenção pode ser alcançado fornecendo-se à planta uma variante de DGAT de alto teor de óleo / alto teor de ácido

oléico, um DGAT de teor normal de óleo, um AAP1, um PESP, uma proteína S24 ribossômica 40S e/ou uma proteína transportadora ABC. Conforme discutido aqui em outro local, muitos métodos são conhecidos na técnica para fornecer um polipeptídeo a uma planta incluindo, mas não limitado a introdução direta do polipeptídeo na planta, e introdução na planta (de modo provisório ou de forma estável) de uma construção de polinucleotídeo codificando o respectivo polipeptídeo. É também reconhecido que os métodos da invenção podem empregar um polinucleotídeo que não é capaz de controlar, na planta transformada, a expressão de uma proteína ou um RNA. Assim, o nível e/ou atividade de uma variante de DGAT de alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico, um DGAT de teor normal de óleo, um AAP1, um PESP, uma proteína S24 ribossômica 40S e/ou uma proteína transportadora ABC pode ser aumentado alterando-se a codificação genética do respectivo polipeptídeo ou seu promotor. Ver, por exemplo, Kmiec, Patente U. S. de número 5.565.350; Zarling e outros, PCT/US93/03868. Conseqüentemente, plantas mutagenizadas que carreguem mutações no gene codificando uma variante de DGAT de alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico, um DGAT de teor normal de óleo, um AAP1, um PESP, uma proteína S24 ribossômica 40S e/ou uma proteína transportadora ABC, onde as mutações que aumentam a expressão do respectivo gene ou aumentam a atividade da variante de DGAT de alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico codificada, DGAT de teor normal de óleo, AAP1, PESP, proteína S24 ribossômica 40S e/ou uma proteína transportadora ABC são fornecidas.

[217]Uma "planta ou célula vegetal de interesse" é

aquela na qual uma alteração genética, como transformação, foi efetuada enquanto um gene de interesse, ou é uma planta ou célula vegetal que é descendente de uma planta ou célula desta forma alterada e que compreende a alteração. Um "controle" ou "planta de controle" ou "célula vegetal de controle" fornece um ponto de referência para medir alterações no fenótipo da planta ou célula de planta de interesse.

[218] Uma planta ou célula vegetal de controle pode compreender, por exemplo: (a) uma planta ou célula do tipo selvagem, isto é, do mesmo genótipo que o material inicial para a alteração genética que resultou na planta ou célula de interesse; (b) uma planta ou célula vegetal do mesmo genótipo que o material inicial mas que foi transformada com uma construção nula (isto é, com uma construção que não possui efeito conhecido no traço de interesse, como uma construção compreendendo um gene marcador); (c) uma planta ou célula vegetal que é um segregante não transformado em meio à progenia de uma planta ou célula vegetal de interesse; (d) uma planta ou célula vegetal geneticamente idêntica à planta ou célula vegetal de interesse mas que não está exposta às condições ou estímulos que induziriam a expressão do gene de interesse; ou (e) a planta ou célula vegetal em si, sob condições nas quais o gene de interesse não é expressado.

[219] O nível de expressão de um polipeptídeo e/ou um RNA pode ser medido diretamente, por exemplo, realizando-se um ensaio quanto ao nível do polipeptídeo ou do RNA na planta, ou indiretamente, por exemplo, medindo-se a atividade do polipeptídeo ou do RNA na planta.

[220]Em modalidades específicas, o polinucleotídeo recombinante da invenção é introduzido na célula vegetal. Subseqüentemente, uma célula vegetal possuindo a seqüência da invenção introduzida é selecionada utilizando-se métodos conhecidos àqueles habilitados na técnica como, mas não limitado a, análise de Southern blot, sequenciamento de DNA, análise de PCR ou análise fenotípica. Uma planta ou parte de planta alterada ou modificada pelas modalidades precedentes é desenvolvida sob condições de formação de planta por um período suficiente para modular a concentração e/ou a composição de polipeptídeos da presente invenção na planta. As condições de formação de planta são bem conhecidas na técnica e discutidas de forma breve em outro local deste.

(B) Modulando Conteúdo de Óleo e/ou Conteúdo de Ácido Oléico de uma Planta ou Parte de Planta

[221]Os métodos da invenção também fornecem modulação do conteúdo de óleo e/ou conteúdo de ácido oléico e/ou proporção de ácido oléico/ácido linoléico de uma planta ou parte da mesma planta. Desta maneira, uma ou mais seqüências associadas a alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico geneticamente ligadas a uma região QTL6 que é flanqueada por uma primeira seqüência de borda que compreende nucleotídeos 1 a 20 da Id. de Seq. n° 2 desta e uma segunda seqüência de borda que compreende os nucleotídeos 477 a 496 da Id. de Seq. n° 46 desta, ou uma região QTL6 que seja flanqueada por uma primeira seq de borda que compreende nucleotídeos 1 a 20 da Id. de Seq. n° 6 desta e uma segunda seqüência de borda que compreende nucleotídeos 482 a 501 da Id. de Seq. n° 14 desta, ou uma

região QTL6 que esteja flanqueada por uma primeira sequência de borda que compreenda nucleotídeos de 1 a 20 da Id. de Seq. n° 10 desta e uma segunda sequência de borda que compreenda nucleotídeos 488 a 507 da Id. de Seq. n° 4 desta podem ser introduzidas em uma planta ou parte desta planta para conferir o fenótipo de alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico e/ou proporção entre ácido oléico/ácido linoléico aumentada na planta ou parte desta planta. Assim, em algumas modalidades, um ou mais dos *loci* marcadores favoráveis identificados aqui são introduzidos na planta ou parte desta planta por métodos bem conhecidos na técnica, incluindo os métodos de transformação e reprodução discutidos aqui acima. Em algumas modalidades, *loci* marcadores favorável compreende as sequências expostas nas Id. de Seq. n° 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, e 51 com pelo menos um polimorfismo contido nestas. Exemplos de polimorfismos específicos em cada *locus* marcador favorável na região QTL6 são identificados na Tabela 2 (*loci* marcadores não codificante) e Tabela 3 (*loci* marcadores compreendendo sequência de codificação) no Exemplo 2 e 4 abaixo. Exemplos não limitantes de sequências de *loci* marcadores favoráveis da invenção são expostos nas Id. de Seq. n° 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, e 47, e os respectivos polimorfismos ocorrendo nestes *loci* marcadores favoráveis são mostrados nas Tabelas 2 e 3 abaixo. Ver também os alinhamentos mostrados nas Figuras 7 a 29 e 31. A introdução de um ou mais destas sequências associadas a alto teor de óleo e/ou associadas a alto teor de ácido

oléico em uma planta ou parte desta planta podem conferir o fenótipo desejado de alto conteúdo de óleo e/ou alto conteúdo de ácido oléico e/ou proporção aumentada de ácido oléico/ácido linoléico.

[222]Em outras modalidades, os métodos da invenção fornecem modulação do conteúdo de óleo e/ou conteúdo de ácido oléico e/ou proporção de ácido oléico/ácido linoléico em uma planta ou parte da mesma planta por superexpressão de um DGAT de teor normal de óleo da presente invenção. Desta maneira, um cassete de expressão compreendendo um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo DGAT de teor normal de óleo da invenção, por exemplo, o polinucleotídeo ZmDGAT1-2 (EF09B) da Id. de Seq. nº 51, codificando o ZmDGAT1-2 (EF09B) da Id. de Seq. nº 52, para fornecer superexpressão deste polipeptídeo, assim aumentando o conteúdo de óleo e/ou conteúdo de ácido oléico e/ou proporção de ácido oléico/ácido linoléico em uma planta ou parte da mesma planta. Assim, em algumas modalidades, um cassete de expressão compreendendo a Id. de Seq. nº 51 ou um polinucleotídeo codificando a Id. de Seq. nº 52 ou uma variante ou fragmento biologicamente ativo deste polipeptídeo é introduzido na planta ou parte desta planta por métodos bem conhecidos na técnica, incluindo os métodos de transformação e reprodução discutidos acima.

[223]Em modalidades específicas, as plantas e partes destas plantas da invenção possuindo o conteúdo de óleo aumentado encontram uso na indústria de moagem em úmido. No processo de moagem em úmido, o propósito é fracionar o cerne e isolar os constituintes químicos de valor econômico em suas partes componentes. O processo permite o

fracionamento de amido em forma altamente purificada, assim como o isolamento em formas cruas de outros materiais incluindo, por exemplo, óleo não refinado, ou como uma ampla mistura de materiais que comumente recebem pouco ou nenhum processamento adicional além da secagem. Portanto, no processo de moagem em úmido o grão é amaciado por impregnação e quebrado por trituração para liberar o germe dos cernes. O germe é separado da mistura de densidade mais pesada de amido, cascas e fibra por "flutuação" dos segmentos de germe livres das outras substâncias em um processo de centrifugação. Isto permite uma separação limpa da fração do grão que contém o óleo dos fragmentos de tecido que contém a maioria do amido. Uma vez que não é econômico extrair o óleo em uma escala pequena, muitas instalações de moagem em úmido enviam seu germe a instalações de produção de óleo centralizadas grandes. O óleo é expelido ou extraído com solventes dos germes secos e a farinha de germe restante é normalmente misturada a farinha de glúten de milho (CGF), um co-produto da moagem em úmido. Desta forma, o amido contido no germe não é recuperado como tal no processo de moagem em úmido e é canalizado para CGF. Ver, por exemplo, Anderson e outros, (1982) *"The Corn Milling Industry"*; *CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture*, A. Wolff, Boca Raton, FL, CRC Press., Inc., Vol. 11, Parte 1, *Plant Products*: 31-61 e Eckhoff (24-26 de junho de 1992) *Proceedings of the 4th Corn Utilization Conference*, St. Louis, MO, impresso pela National Corn Growers Association, CIBA-GEIGY Seed Division e USDA, ambas as quais estão aqui incorporadas por referência.

(C) Métodos para Melhorar a Qualidade da Alimentação

[224]São fornecidos métodos para melhorar a qualidade do tecido de um animal alimentando-se um animal com uma dieta compreendendo uma planta ou parte de uma planta da presente invenção que possua um conteúdo de óleo aumentado e/ou conteúdo de ácido oléico aumentado. Tais métodos compreendem alimentar o animal com uma dieta compreendendo quantidade suficiente de um grão ou óleo da invenção que compreende o conteúdo de óleo aumentado e/ou conteúdo de ácido oléico aumentado.

[225]O alimento empregado na dieta pode compreender cerca de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% do grão da invenção (isto é, um grão compreendendo uma variante de alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico de DGAT, o grão compreendendo um cassete de expressão que possibilita a superexpressão de um DGAT de teor normal de óleo aqui divulgado, combinações destes e similares). Em outras modalidades, o alimento empregado na dieta pode compreender cerca de 1% a cerca de 15%, cerca de 10% a cerca de 25%, cerca 20% a cerca de 35%, cerca de 30% a cerca de 45%, cerca de 40% a cerca de 55%, cerca de 50% a cerca de 65%, cerca de 60% a cerca de 75%, cerca de 70% a cerca de 85%, cerca de 80% a cerca de 95% ou cerca de 90% a 100% do grão de invenção.

[226]A qualidade do tecido de qualquer animal pode ser melhorada. Animais de interesse incluem, mas não estão limitados a animais ruminantes, incluindo, mas não limitados a gado bovino, búfalos ou carneiros, assim como animais não ruminantes incluindo, mas não limitados a suínos, aves (isto é, galinhas, galinhas poedeiras, peru,

avestruzes e emas) ou peixes.

[227]Na modalidade específica, a planta, parte de planta, semente, grão ou óleo é um constituinte de alimentação animal ou um produto alimentício. Plantas ou partes destas da presente invenção podem ser utilizadas em métodos, por exemplo, sem limitação, para se obter uma semente, farinha, matéria-prima ou óleo. Plantas utilizadas em tais métodos podem ser processadas. Assim sendo, a presente invenção fornece uma semente, grão, alimento e/ou óleo que são produzidos a partir de uma planta ou parte de planta possuindo um conteúdo de óleo aumentado e/ou conteúdo de ácido oléico aumentado e/ou proporção entre ácido oléico/ácido linoléico aumentada conforme aqui descrito. Métodos para produção de preparações de alimento, farinha, proteína e óleo a partir de várias partes de plantas são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Patentes U. S. de número 4.957.748, 5.100.679, 5.219.596, 5.936.069, 6.005.076, 6.146.669 e 6.156.227. É fornecida ainda uma carne produzida a partir de animais sendo alimentados com a planta, parte de planta, grão e/ou óleo possuindo um conteúdo de óleo aumentado e/ou conteúdo de ácido oléico aumentado e/ou proporção entre ácido oléico/ácido linoléico aumentada conforme aqui descrito em outro local.

(D) Métodos para utilização de seqüências promotoras de ZmDGAT1-2, ZmAAP1, ZmPESP, ZmS24 e ZmABCT

[228]A seqüência de nucleotídeo para o promotor de ZmDGAT1-2 (Mo17), ZmDGAT 1-2 (ASK), ZmAAP1, ZmPESP (Mo17), ZmPESP (ASK), ZmS24, ou ZmABCT divulgada na presente invenção, assim como os variantes e fragmentos desta, é

útil na manipulação genética de qualquer planta quando montada com uma construção de DNA de forma que a sequência promotora esteja operativamente ligada com uma sequência de nucleotídeo heteróloga codificando uma proteína de interesse. Desta maneira, a sequência de nucleotídeo promotor de ZmDGAT1-2 (Mo17), ZmDGAT 1-2 (ASK), ZmAAP1, ZmPESP (Mo17), ZmPESP (ASK), ZmS24 ou ZmABCT da invenção é fornecido em cassetes de expressão juntamente com sequências de nucleotídeo heterólogas para expressão na planta de interesse.

[229] Regiões de promotores híbridos sintéticos são conhecidos na técnica. Tais regiões compreendem elementos de promotor à montante de uma sequência de nucleotídeo ligada de forma operativa ao elemento promotor de outra sequência de nucleotídeo. Em uma modalidade da invenção, a expressão de gene heterólogo é controlada por um promotor híbrido sintético compreendendo a sequência promotora ZmDGAT1-2 (Mo17), ZmDGAT1-2 (ASK), ZmAAP1, ZmPESP (Mo17), ZmPESP (ASK), ZmS24 ou ZmABCT da invenção ou uma variante ou fragmento desta, ligada de forma operativa a elemento(s) promotor(es) à montante de um promotor heterólogo. Elementos promotores à montante têm sido identificados e podem ser utilizados para gerar um promotor sintético. Ver, por exemplo, Rushton e outros (1998) *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:311-315. Alternativamente, uma sequência de promotor ZmDGAT1-2 (Mo17), ZmDGAT1-2 (ASK), ZmAAP1, ZmPESP (Mo17), ZmPESP (ASK), ZmS24 ou ZmABCT sintético pode compreender duplicações dos elementos promotores à montante encontrados na sequência de promotor ZmDGAT1-2 (Mo17), ZmDGAT1-2 (ASK), ZmAAP1, ZmPESP (Mo17), ZmPESP (ASK), ZmS24

ou ZmABCT. É reconhecido que uma sequência de promotor ZmDGAT1-2 (Mo17), ZmDGAT1-2 (ASK), ZmAAP1, ZmPESP (Mo17), ZmPESP (ASK), ZmS24 ou ZmABCT da invenção pode ser utilizada com sua sequência de codificação de ZmDGAT1-2 (Mo17), ZmDGAT1-2 (ASK), ZmAAP1, ZmPESP, ZmS24 ou ZmABCT nativa. Uma construção de DNA compreendendo promotor ZmDGAT1-2 (Mo17), ZmDGAT1-2 (ASK), ZmAAP1, ZmPESP (Mo17), ZmPESP (ASK), ZmS24 ou ZmABCT ligado de forma operativa com sua sequência de codificação de ZmDGAT1-2 (Mo17), ZmDGAT1-2 (ASK), ZmAAP1, ZmPESP, ZmS24 ou ZmABCT nativa pode ser utilizada para transformar qualquer planta de interesse para produzir uma mudança de fenótipo desejada. Onde o promotor e seu gene nativo ocorrem naturalmente na planta, isto é, no milho, a transformação de planta com estas sequências ligadas de forma operativa também resulta ou em uma mudança de fenótipo, como um conteúdo de óleo aumentado, conteúdo de ácido oléico aumentado e/ou proporção entre ácido oléico/ácido linoléico aumentada, ou na inserção de sequências ligadas de forma operativa em uma região diferente do cromossomo alterando assim o genoma da planta.

[230] Em outra modalidade da invenção, cassetes de expressão compreenderão uma região de iniciação transcricional compreendendo a sequência de nucleotídeo promotor de ZmDGAT1-2 (Mo17), ZmDGAT1-2 (ASK), ZmAAP1, ZmPESP (Mo17), ZmPESP (ASK), ZmS24 ou ZmABCT aqui divulgadas, ou variantes ou fragmentos destas, ligadas de forma operativa à sequência de nucleotídeo heterólogo de cuja expressão deve ser controlada pelo promotor de ZmDGAT1-2 (Mo17), ZmDGAT1-2 (ASK), ZmAAP1, ZmPESP (Mo17),

ZmPESP (ASK), ZmS24 ou ZmABCT da invenção.

[231]A sequência de nucleotídeo promotor e métodos divulgados aqui são úteis na regulação da expressão de qualquer sequência de nucleotídeo heteróloga em uma planta hospedeira a fim de variar o fenótipo de uma planta. Várias mudanças em fenótipo são de interesse, incluindo a modificação da composição de ácido graxo em uma planta, a alteração do conteúdo de aminoácido de uma planta, a alteração de um mecanismo de defesa contra patógenos de uma planta e similares. Estes resultados podem ser alcançados fornecendo-se a expressão de produtos heterólogos ou a expressão aumentada de produtos endógenos em plantas. Alternativamente, os resultados podem ser alcançados atendendo-se à necessidade por uma redução de expressão de um ou mais produtos endógenos, particularmente enzimas ou co-fatores na planta. Estas mudanças resultam em uma mudança no fenótipo da planta transformada.

[232]Os seguintes exemplos são oferecidos por meio de ilustração e não por meio de limitação.

EXPERIMENTAL

Exemplo 1: Mapeamento de QTL6 de Óleo/Ácido Oléico e Informação de Sequência

[233]ASKC28IB1, uma linha consanguínea derivada do ciclo 28 da população sintética de cerne único Alexho (ASK) foi utilizada como doador de alto teor de óleo e EF09B como um pai recorrente em uma série de populações de retrocruzamento contínuas. Para o mapeamento de QTL de óleo inicial, 300 cernes BC1 foram plantados, discos de folha foram coletados de cada muda e o DNA foi extraído. Genotipia de todo o genoma foi executada com todas as mudas

individuais utilizando-se marcadores SSR igualmente distribuídos em 10 cromossomos de milho. Todas as 300 plantas BC1 foram retrocruzadas com EF09B para produzir sementes BC2. Dez a 20 cernes de cada espiga de BC2 madura foram analisados por NMR para determinar a quantidade de óleo assim como a concentração de óleo em bases por cerne ou por embrião. Para o óleo de semente, cernes secos ao ar foram utilizados para orientar as medições NMR. Para óleo de embrião, os cernes foram encharcados em água durante a noite. Os embriões foram dissecados de seus endospermas, secos a vácuo e submetidos a análise por NMR.

[234]O mapeamento foi executado utilizando-se dados de marcador das mudas BC1 e dados do óleo das espigas BC2. O mapeamento por intervalo composto de traços de óleo foi executado utilizando-se o programa Windows QTL Cartographer (Wang e outros, North Carolina State University). O nível de significância de QTL para cada traço foi determinado por 300 permutações a $p < 0,05$.

[235]Um QTL de teor de óleo de embrião e teor de óleo de cerne significativo foi detectado no cromossomo seis (QTL6). Os resultados do mapeamento derivados da concentração de óleo no embrião são mostrados na Figura 1. O QTL6 está localizado entre os marcadores PHI077 (51,2 cM, IBM2+, mapa de meiose simples) e EST723482 (98,4 cM) e com um valor de pico em torno de UMC1918 (Figura 1). Estes resultados são consistentes com aqueles de Zhong e Williams (2003, dados não mostrados) obtidos de um estudo de mapeamento em uma população F2 derivada de um cruzamento entre ASKC28IB1 e FB1 consangüíneos.

[236]O mapeamento fino de QTL6 foi atingido

utilizando-se sobreposição de linhas quase isogênicas desenvolvidas ao em torno da região QTL6 (Figura 2). Eventos recombinantes entre PHI077 e EST723482 foram identificados a partir de vários estágios e autopolinizados por duas ou mais gerações para produzir linhas quase isogênicas (NILs). Séries de sobreposições próximas a NILs foram desenvolvidas em BC3S2, BC3S3 E BC4S2. Nas gerações de retrocruzamento e autopolinização subseqüentes, aplicou-se seleção assistida por marcador (MAS) de todo o genoma a cada geração para acelerar a seleção de indivíduos que apenas contêm o genoma ASKC28IB1 na região QTL6. Foi estimado que muitos indivíduos selecionados para desenvolvimento de NIL continham mais de 97,5% e 99% de seus genomas de pai EF09B para BC3 e BC4 respectivamente.

[237]A fim de mapear QTL6 em uma resolução muito mais alta, marcadores SSR e SNP adicionais em torno da região QTL6 foram também desenvolvidos utilizando-se informação de seqüência proprietária ou informação de seqüência de extremidade BAC pública. Os marcadores utilizados neste projeto e alguns marcadores em torno dessa região utilizados e publicados por vários autores, são mostrados na Tabela 1 abaixo.

[238]**Tabela 1. Marcadores utilizados para mapeamento fino de teor de óleo /ácido oléico em QTL6.** Marcadores em preto são marcadores Pioneer SSR ou SNP utilizados no mapeamento de QTL6. Eles são desenvolvidos a partir de seqüências proprietárias Pioneer (S) ou a partir de seqüências públicas (N). Se conhecido, as posições no mapa são fornecidas em três diferentes mapas, meiose simples IBM2+ (V 1.5); Visinhos IBM2+ (V 1.6) e Diversidade Pioneer

(V 1.4). Marcadores em várias cores são citados a partir de referências dadas abaixo: 1. Mangolin e outros, 2004, *Mapping QTLs for kernel oil content in a tropical maize population*, Euphytica, 137:251-259. 2. Song e outros, 2004, *QTL mapping of kernel oil concentration with high-oil maize by SSR markers*, Maydica, 49:41-48. 3. Alrefai e outros, 1995, *Quantitative trait locus analysis of fatty acid concentration in maize*, Genoma, 38:894-901. 4. Johnson e Rocheford, 2003, *Evaluation of Near-Isogenic Lines for QTL for kernel concentration in maize*, Illinois Corn Breeder's School, páginas 126-149.

	Proprietário Pioneer	MaTipo de Marcador	n° de Crom.	MS IBM2+	Vizinhos IBM2+	Diversi- dade	Refe- rência
PHI077	S	SSR	6	51,2	98,4	101,7	
UMC1133	N	Micros- satélite	6	51,2	98,6	104,4	1
UMC1595	H	SSR	6	65	153,7	213,6	2
MZA10275	S	SNP	6	66,5	158,7	230,8	
MZA6770	S	SNP	6			230,8	
MZA8079	S	SNP	6			231,6	
EST450983	S	SSR	6	70	166,6	261,1	
MZA9164	S	SNP	6	70,2	166,8	246,5	
MZA11710	S	SNP	6	70,2	166,8	247,8	
MZA11918	S	SNP	6			259,3	
MZA10187	S	SNP	6	70,2	166,8	261,1	
ISIWCS5	N	RFLP	6	75,6	181,9		3
BAC02	S	SNP	6				
UMC1918	N	SSR	6	78,4	189,9	268,1	
BNLG480	N	SSR	6		196,1		4

(ZCA480)							
BAC05	S	SNP	6				
BAC20	S	SNP	6				
BAC18	S	SNP	6				
QTL6SNP7	S	SNP	6				
BAC22	S	SNP	6				
BAC24	S	SNP	6				
BAC17	S	SNP	6				
QTL6SNP8	S	SNP	6				
QTL6SNP9	S	SNP	6				
QTL6SNP13	S	SNP	6				
QTL6SNP14	S	SNP	6				
QTL6SNP15	S	SNP	6				
QTL6SNP16	S	SNP	6				
QTL6SNP17	S	SNP	6				
BAC32	S	SNP	6				
BAC29	S	SNP	6				
MZA5002	S	SNP	6	80,8	199	274,4	
MZA13321	S	SNP	6			274,4	
MZA15785	S	SNP	6	80,8	199	274,9	
MZA13118	S	SNP	6	80,8	199	274,9	
MZA11771	S	SNP	6	80,8	199	289,2	
UMC1857	N	SSR	6	81,4	203,2	275,3	
MZA9351	S	SNP	6			277,0	
MZA8135	S	SNP	6	84,5	211,5	278,2	
NC009	N	SSR	6	84,5	211,5	278,2	4
UMC1014	N	SSR	6	84,5	211,5	278,2	4
MZA15691	S	SNP	6			291,1	
MZA8616	S	SNP	6			294,2	

MZA146	S	SNP	6	84,5	211,5	294,8	
MZA18413	S	SNP	6	84,5	211,5	302,2	
MZA8593	S	SNP	6	84,5	211,5	304,6	
EST653931	S	SSR	6	84,5	211,5	304,6	
EST628314	S	SSR	6	84,5	211,5	334,4	
UMC2319	N	SSR	6	96,7	244,9		2
EST723482	S	SSR	6	98,4	253	330,6	
UMC1614	N	Micros- satélite	6	103,4	236,9		1
MZA13718	S	SNP	6			316,8	

[239] Dados relacionados a óleo foram obtidos dos NILs sobrepostos e classificados de acordo com diferentes classes de marcadores. Para cada par NIL, dados de óleo e perfis de ácido graxo foram obtidos a partir de cinco espigas homozigotas para alelo ASK (QTL6+/+) e cinco espigas homozigotas para alelo EF09B (QTL6-/-). Dados da classe QTL6+/+ e classe QTL6-/- foram comparados e uma diferença significativa em $p < 0,01$ entre a classe ASK homozigota (QTL6+/+) e a classe de EF09B homozigota (QTL6-/-) sugeriu a presença de QTL6. Em BC3S2, a QTL6 foi mapeada a uma região de 10,8 cM (entre os marcadores EST450983 e MZA5002). Em BC3S3 e BC4S2, a QTL6 foi mapeada adicionalmente a uma pequena região entre os marcadores BAC18 e BAC29 (Figura 2). Esta região corresponde a três clones BAC sobrepostos (b121c.n3, b33a.k3 e be46c.n5) no mapa físico de Mol7 consanguíneo. Sequências destes três BACs foram determinadas e a inserção genômica total nos três clones é de aproximadamente 280 kb. As inserções genômicas nos 3 clones BAC Mol7 sequenciados são apresentadas em três fragmentos genômicos separados, Id. de

Seq. n° 116, Id. de Seq. n° 117 e Id. de Seq. n° 118, devido a alguns espaços não resolvidos.

[240]O fragmento maior, Id. de Seq. n° 116, é 263762-bp em comprimento e contém ORFs para Proteína do Sistema de Efluxo K⁺ (ZmPESP; proteína mostrada na Id. de Seq. n° 56), proteína ZmDGAT1-2 (Mo17) mostrada na Id. de Seq. n° 50, codificando a sequência (cDNA) mostrada na Id. de Seq. n° 49), e transportador ABC semelhante a PDR (ZmABCT; proteína mostrada na Id. de Seq. n° 64, sequência de codificação (cDNA) mostrada na Id. de Seq. n° 63). Assim, os nucleotídeos (nt) 153888-156887 da Id. de Seq. n° 116 representa o promotor ZmPESP (Mo17) (exposto na Id. de Seq. n° 121); nt 156888-165958 da Id. de Seq. n° 116 representa a sequência de codificação (seqüências íntron mais exon) para ZmPESP; nt 165959-166382 da Id. de Seq. n° 116 representa a sequência ZmPESP 3'-UTR; o filamento complementar a nt 173344-176343 da Id. de Seq. n° 116 representa o promotor ZmDGAT1-2 (Mo17) (filamento complementar a este promotor é exposto na Id. de Seq. n° 119); o filamento complementar a nt 167385-173343 da Id. de Seq. n° 116 representa a sequência de codificação (seqüência exon mais íntron) para ZmDGAT1-2 (Mo17); o filamento complementar a nt 167035-167384 da Id. de Seq. n° 116 representa a sequência ZmDGAT1-2 (Mo17) 3'-UTR; nt 254826-257825 da Id. de Seq. n° 116 representa o promotor ZmABCT (expoto na Id. de Seq. n° 124); nt 257826-263762 da Id. de Seq. n° 116 representa a sequência de codificação parcial (seqüências exon mais íntron) para ZmABCT; e nt 167035-167384 da Id. de Seq. n° 116 representa a sequência ZmABCT 3'-UTR.

[241]O segundo fragmento (Id. de Seq. n° 117) é 1191 bp e contém ORFs para 40 proteínas ribossômicas (ZmS24; proteína mostrada na Id. de Seq. n° 60, sequência de codificação (cDNA) mostrado na Id. de Seq. n° 59) e aminoácido permease (ZmAAP1; proteína mostrada na Id. de Seq. n° 56, sequência de codificação (cDNA) mostrada na Id. de Seq. n° 55). Assim, nt 1824-4823 da Id. de Seq. n° 117 representa o promotor ZmS24 (exposto na Id. de Seq. n° 123); nt 4824-5994 da Id. de Seq. n° 117 representa a sequência de codificação de ZmS24 (seqüências íntron mais exon); nt 5995-6160 da Id. de Seq. n° 117 representa a sequência ZmS24 3'-UTR; nt 6161-6888 da Id. de Seq. n° 117 representa o promotor de ZmAAP1 (exposto na Id. de Seq. n° 120); nt 6889-8556 da Id. de Seq. n° 117 representa a sequência de codificação de ZmAAP1 (seqüências exon mais íntron); nt 8557-8822 da Id. de Seq. n° 117 representa a sequência ZmAAP1 3'-UTR.

[242]O terceiro fragmento (Id. de Seq. n° 118) possui 6268 bp e não contém ORFs.

[243]A seqüência genômica ASK28IB1 para a região QTL6 foi também obtida. Uma biblioteca BAC foi construída utilizando-se DNA isolado de folhas de ASKC28IB1 e selecionada utilizando-se seqüência BAC 17 (Id. de Seq. n° 3) como um marcador. Um dos clones BAC positivos (clone ASKBAC F4) foi seqüenciado e anotado. A inserção neste clone é de 82725 pares de base (Id. de Seq. n° 128) e contém dois genes, PESP e DGAT1-2. Os outros três genes (Proteína S24 ribossômica 40S, AAP e ABCT) encontrados nos BACs Mo17 estavam fora da região coberta pelo clone F4. As posições de nucleotídeo para promotor, codificação e 3' UTR

para ambos os genes PESP e DGAT1-2 no clone BAC ASKC28IB1 são descritas abaixo.

[244]A sequência genômica ASKC28IB1 (ASK) de 82725 bp (Id. de Seq. nº 128) contém o ORF para a proteína ZmPESP (ZmS24; mostrada na Id. de Seq. nº. 57 (sequência de codificação (cDNA) mostrado na Id. de Seq. nº 56) e a proteína ZmDGAT1-2 (ASK) mostrada na Id. de Seq. nº 48 (sequência de codificação (cDNA) mostrada na Id. de Seq. nº 47). Assim, os nucleotídeos (nt) 9306-12305 da Id. de Seq. nº 128 representa o promotor de ZmPESP (ASK) (exposto na Id. de Seq. nº 129); nt 12306-21370 da Id. de Seq. nº 128 representa a sequência de codificação (seqüências exon mais íntron) para ZmPESP; nt 21371-21794 da Id. de Seq. nº 128 representa a sequência ZmPESP 3'-UTR; o filamento complementar a nt 29472-32471 da Id. de Seq. nº 128 representa o promotor ZmDGAT1-2 (ASK) (filamento complementar a este promotor é exposto na Id. de Seq. nº 130); o filamento complementar para nt 22774-29471 da Id. de Seq. nº 128 representa a sequência de codificação (seqüências exon mais íntron) para ZmDGAT1-2 (ASK); e o filamento complementar a nt 22365-22773 da Id. de Seq. nº 128 representa a sequência ZmDGAT1-2 (ASK) 3'-UTR.

[245]QTL6 pode ser adicionalmente definida a um fragmento de aproximadamente 195 kb, entre BAC18 e BAC29 (Figura 2).

[246]Os dados de óleo destes NILs mostram que a QTL6 consistentemente aumenta as concentrações de óleo no embrião e na semente em múltiplas gerações. Os dados de óleo de BC3S2 e BC4S2 são resumidos na Figura 3. A QTL6 aumenta a concentração de óleo no embrião de 31,6% a 35,8%

(um aumento de 13%) em BC3S2 e de 28,7% a 33,3% (um aumento de 16%) em BC4S2. Ela também aumenta a concentração de 4,4% a 5,1% (um aumento de 17%) em BC3S2 e de 3,7% a 4,4% (um aumento de 19%) em BC4S2. Acredita-se geralmente que esse milho de alto teor de óleo também contém um nível aumentado de ácido oléico (18:1). Adicionalmente, uma QTL maior controlando a proporção de ácido oléico (18:1) e linoléico (18:2) foi mapeada no cromossomo 6 por diferentes grupos (Alrefai e outros, (1995) *Genome* 38:894-901; Poneleit e outros, (1976) *Agron. Abs.* 8:59).

[247]O presente estudo investiga se os NILs desenvolvidos para QTL6 também continham níveis aumentados de ácido oléico. Perfis de ácidos graxos para classes ASK e EF09B homozigotas em sementes BC3S2, BC3S2, e BC4S2 foram obtidos. Os dados para BC3S2 e BC4S2 são resumidos na Figura 4. Certamente a QTL6 também aumenta consistentemente a concentração de ácido oléico em sementes em múltiplas gerações. Em BC3S2, a QTL6 aumentou a concentração de ácido oléico de 24,6% a 36,2% (um aumento de 47%) e reduz a concentração de ácido linoléico de 58,5% a 46,4% (uma redução de 21%). Em BC4S2, a QTL6 aumenta a concentração de ácido oléico de 23,6% a 37,9% (um aumento de 61%) e reduz a concentração de ácido linoléico de 59,8% a 45,4% (uma redução de 24%). Embora as concentrações de ácidos graxos nos embriões não fossem diretamente medidas, é razoável assumir que a maioria das mudanças observadas devem-se a mudanças nos embriões uma vez que o teor de óleo dos embriões representam aproximadamente 90% do óleo de semente total. Na resolução de mapeamento de 195 kb, os fenótipos de teor de óleo aumentado e de teor de ácido oléico

aumentado não segregam, sugerindo que os genes responsáveis por ambos os fenótipos estão localizados na região de 195 kb.

[248]Em teoria, o milho com maior conteúdo de óleo além da QTL6 pode ser produzido por empilhamento molecular ou genético da QTL6 com outro QTL de teor de óleo ou outros genes conhecidos por aumentarem o teor de óleo. O cotilédone folhoso 1 (LEC1) de milho é um fator de transcrição de domínio B (ver Figuras 38 e 39) anteriormente mostrado aumentando o teor de óleo do embrião (ver Figura 5). Para determinar se LEC1 pode aumentar ainda mais o teor de óleo, uma linha homozigótica BC2S2 para QTL6 derivada da população ASKC28IB1 x EF09B foi cruzada com plantas homozigóticas contendo o transgene ÇEC1 de milho. O teor de óleo do embrião e semente das plantas F1 resultantes foram analisados e os dados foram comparados àqueles obtidos de plantas carregando QTL6 e LEC1 apenas. Os resultados indicam que QTL6 e LEC1 possuem efeitos aditivos na concentração de óleo no embrião assim como da semente e empilhar geneticamente LEC1 e QTL6 pode elevar a concentração de óleo no embrião a cerca de 40% e concentração de óleo da semente a cerca de 6% em plantas heterozigóticas (Figura 5).

[249]Para identificar os genes responsáveis pelo aumento de óleo e ácido oléico em QTL6, os três clones de BAC Mo17 (b121c.n3, b33a.k3 e be46c.n5) foram sequenciados e anotados. O programa FGENESH (Softberry, Inc. 116 Radio Circle, Suite 400 Mount Kisco, NY 10549) foi utilizado para prever os genes localizados nos três clones de BAC. Na região entre BAC18 e BAC29 (aproximadamente 195 kb), cinco

quadros de leitura aberta (ORFs) compartilhando significativa homologia com os genes conhecidos foram identificados. Eles codificam uma proteína de sistema de efluxo K⁺ (PESP), uma diacylglycerol O-aciltransferase do tipo 1 (DGAT1-2), uma proteína S24 ribossômica 40S, uma aminoácido permease (AAP) e um transportador ABC semelhante a PDR (ABCT). Os cinco ORFs e alguns marcadores proximamente ligados são mostrados na Figura 6.

[250]É bem conhecido na técnica que DGAT está envolvido na última etapa de biossíntese de triacylglycerol (TAG). As seqüências cDNA para o gene DGAT (DGAT 1-2) localizadas na região QTL6 de diversos consangüíneos diferentes foram obtidas, incluindo ASKC28IB1, EF09B, Mol7, e B73. A seqüência do alelo B37 foi derivada dos clones EST Pionner existentes. A seqüência do alelo Mol7 foi deduzida a partir das seqüências do clone BAC descritas abaixo. As seqüências de alelo ASKC28IB1 e EF09B foram clonadas de embriões imaturos por RT-PCR. De forma breve, o RNA total foi extraído de homozigotos dos pares NIL de BC4S2 para ASK (QTL6+/+) ou EF09B (QTL6-/-). O primeiro filamento de cDNA foi sintetizado utilizando-se iniciadores de poli(dT). O comprimento total de cDNA foi amplificado por PCR a partir do primeiro filamento de cDNA utilizando os seguintes iniciadores: iniciador de avanço, 5'-ctggaaccttcctcgcatggcccg (94784) (Id. de Seq. nº 114); iniciador reverso 5'-ctatctacttgccctgggcctgcctgttc (94785) (Id. de Seq. nº 115). O alinhamento da seqüência de DNA destes quatro alelos é mostrado na Figura 31. Em nível de nucleotídeo, ASK e alelos normais possuem modificações em nove locais e as mudanças em quatro destes locais levam a

mudanças em aminoácidos (Figura 30). Análises mais detalhadas destas modificações estão presentes no Exemplo 4 abaixo.

Exemplo 2: Informação de Marcador e Iniciador

[251] Marcadores polimórficos de nucleotídeo simples (SNP) foram desenvolvidos a partir de seqüências de extremidade BAC das três seqüências BAC de Mo17 cobrindo a região QTL6. Exemplos não limitantes de marcadores polimórficos entre alelos ASKC28IB1 (ASK; uma linha de alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico) e EF09B (linha de teor de óleo normal) são expostos nas Figuras 11 a 25. A Tabela 2 abaixo mostra os polimorfismo únicos aos marcadores QTL6 de ASK que não são encontrados nos locais de marcador correspondentes na região QTL6 das linhas de teor normal de óleo (Id. de Seq. n° para EF09B é utilizada como a seqüência de referência).

[252] Tabela 2. Locais dos polimorfismos nos loci marcadores da região QTL6 de milho. Os identificadores de seqüência referem-se ao locus marcador específico para EF09B (linha consanguínea de milho de teor normal de óleo). NT, a posição de nucleotídeo no identificador de seqüência para EF09B onde um polimorfismo foi identificado no locus marcador correspondente para ASK (linha consanguínea de milho de alto teor de óleo, alto teor de ácido oléico); "mudança polimórfica" refere-se à substituição, inserção ou deleção específica ocorrendo no locus marcador correspondente para ASK.

Locus Marcador	Id. de Seq. n°	NT	Mudança Polimórfica
QTL6BAC05	2	34	G → A

		35	C → T
		73	C → T
		74	A → G
		90	G → C
		110	C → T
		122	deleção de A
		123	deleção de T
		137	T → G
		138	C → T
		185	C → G
		186	A → G
		194	G → C
		214	A → G
		230	T → C
		256	A → T
		336	T → C
		359	G → C
		373	inserção de A
		403	T → A
		449	T → C
		481	C → A
		495	T → C
QTL6BAC17	4	28	C → T
		204	A → C
		256	G → A
		302	A → T
		305	A → C
		341	G → C
		429	C → G

		461	C → G
QTL6BAC18	6	43	C → A
		74	C → T
		208	A → C
		224	A → G
QTL6BAC20	8	25	A → G
		55	G → A
		88	C → T
		100	G → A
		195	C → T
		223	A → G
		238	T → C
		242	C → T
		255	T → C
		279	A → G
		306	T → C
		307	inserção de 79 nucleotídeos
		345	T → C
		399	G → A
QTL6BAC22	10	40	deleção de A
		41	deleção de C
		88	A → C
		89	C → G
		126	C → T
		134	T → A
		146	C → A
		218	deleção de G
QTL6BAC24	12	128	T → C

		195	T → C
		256	G → A
		257	T → A
		293	deleção de C
		294	deleção de C
		295	deleção de T
		296	deleção de T
		327	C → A
QTL6BAC29	14	262	T → C
		311	G → A
QTL6BAC32	16	428	C → G
QTL6SNP7	18	119	C → A
		396	C → G
		420	G → A
QTL6SNP8	20	194	A → T
		258	deleção de G
		259	deleção de G
		260	deleção de G
		365	C → G
		366	C → G
		489	A → G
QTL6SNP9	22	48	A → C
		50	G → A
		56	deleção de T
		60	A → G
		63	C → T
		101	T → C
		133	C → T
		166	deleção de C

		170	G → A
		179	A → G
		181	inserção de 2 nucleotídeos (AC)
		206	deleção de G
		207	deleção de A
		211	T → C
		231	T → G
		237	A → G
		255	inserção de T
		273	T → C
		282	G → A
		294	C → G
		312	Y → C
		324	C → T
		343	T → C
		345	T → C
		358	C → T
		377	A → T
		381	G → A
		385	G → A
		387	A → C
		404	W → T
QTL6SNP13	24	358	A → T
		359	G → A
		371	inserção de dois nucleotídeos (AG)
		421	G → T
		422	A → C

		423	deleção de T
		425	C → A
		426	A → G
QTL6SNP14	26	28	C → T
		31	G → C
		35	C → T
		43	A → T
		50	deleção de C
		111	G → C
		117	G → T
		143	A → G
		192	C → T
		197	T → C
		219	C → A
		266	A → T
QTL6SNP15	28	41	T → G
		62	C → G
		92	C → T
		158	C → T
		182	T → C
		194	T → G
		200	G → C
		226	C → T
		229	C → T
		349	A → C
QTL6SNP16	30	102	T → C
		145	C → A
		162	C → T
		165	A → T

		198	R → G
		199	M → G
		221	C → T
		247	G → A
		251	C → T
		253	G → T
		306	Y → T
		331	M → C
		352	T → C
		451	T → C
		461	C → T
		464	S → C
QTL6SNP17	32	61	T → C
		73	T → C
		87	C → T
		143	inserção de 5 nucleotídeos (AGCTA)
		199	C → G
		208	deleção de C
		209	deleção de A
		210	deleção de T
		211	deleção de G
		225	A → C
		327	deleção de T
		328	deleção de C
		335	inserçã de T
MZA5002	34	60	G → C
		63	C → G
		138	G → C

		192	$G \rightarrow C$
		315	$C \rightarrow G$
		353	deleção de C
		354	deleção de G
		355	deleção de G
		356	deleção de C
		357	deleção de G
		358	deleção de G
		359	deleção de C
		360	deleção de C
		361	deleção de G
		377	$A \rightarrow C$
		378	$G \rightarrow C$
		383	$C \rightarrow A$
		386	$A \rightarrow C$
		387	$G \rightarrow C$
		389	$A \rightarrow C$
		427	$T \rightarrow A$
		428	$C \rightarrow G$
		430	$G \rightarrow T$
		431	$G \rightarrow T$
		433	deleção de G
		434	deleção de C
		522	$T \rightarrow C$
MZA13321	36	17	$A \rightarrow C$
		25	$Y \rightarrow C$
		32	$Y \rightarrow C$
		110	$G \rightarrow C$
MZA15785	38	326	$G \rightarrow A$

		402	T → A
MZA13118	40	34	A → C
		169	A → G
MZA11771	42	164	T → C
		268	G → A
		435	T → G
MZA9351	44	17	T → A
		21	G → A
		23	G → T
		54	T → C
		134	T → C
		137	C → T
MZA8135	46	54	C → A
		60	inserção de A
		64	G → T
		87	C → G
		94	T → C
		95	A → C
		126	C → T
		161	G → A
		163	C → T
		234	C → T
		237	T → C
		297	A → G
		319	T → A
		320	deleção de T
		321	deleção de T
		323	A → C
		394	inserção de 2 nucleotídeos

			(TA)
		395	A → T
		468	inserção de 2 nucleotídeos (TC)
ZmDGAT1-2	51	134	T → G
		163	C → T
		190, 193, 196, ou 199	deleção de C
		191, 194, 197, ou 200	deleção de A
		192, 195, 198, ou 201	deleção de G
		1401, 1404, ou 1407	inserção de 2 nucleotídeos (TTC) imediatamente após esta posição de nucleotídeo

[253] Iniciadores adequados para detecção da presença destes loci marcadores em uma planta ou tecido de planta são expostos nas Figura 7 a 29 e Id. de Seq. nº 68 a 115 e 124 a 127.

Exemplo 3: Reprodução Assistida por Marcador para QTL6

[254] Este exemplo expõe o uso dos polimorfismos nos vários marcadores moleculares de QTL6 para acelerar a incorporação do traço de alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico em outro germoplasma de milho com o resultado de aumentar o teor de óleo e/ou teor de ácido oléico no embrião e no cerne.

[255]A presente invenção fornece um pé de milho com conteúdo de óleo e/ou ácido oléico no embrião e/ou cerne aumentado(s) selecionado com o uso de reprodução assistida por marcador onde uma população de plantas são selecionadas para a presença de pelo menos uma das seqüências polimórficas exportas no Exemplo 2. A seleção de plantas possuindo pelo menos uma das seqüências polimórficas associadas ao traço de alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico compreende marcar o DNA genômico da planta resultante, através do processo de seleção, para a presença do polimorfismo. As plantas contendo o *locus* marcador desejado continuam na reprodução e no processo de seleção.

[256]Além disso, uma vez que a concentração de ácido oléico mostra um aumento maior que o conteúdo de óleo em plantas transportando o *locus* marcador de QTL6 de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico e podem ser medidas com precisão, isto pode ser utilizado para monitorar e confirmar a presença de QTL6 durante o processo de reprodução assistida por marcador. Assim, por exemplo, qualquer pé de milho dado ou a progenia resultante dos cruzamentos ou retrocruzamentos entre pés de milho pode ser selecionado pela presença do *locus* marcador de QTL6 examinando-se seu conteúdo de ácido oléico, particularmente em todo o cerne ou embrião. Desta maneira, a concentração de ácido oléico de uma semente ou embrião de pelo menos 35% (isto é, 35% ou mais do óleo da semente ou embrião é representado por ácido oléico) seria preditivo de que a planta provavelmente compreende o *locus* marcador de QTL6 desejado e assim poderia prosseguir de forma benéfica no processo de reprodução e seleção. Alternativamente, a

concentração de ácido oléico em uma semente ou embrião de menos de 35% (isto é, o ácido oléico representa menos de 35% do óleo da semente ou embrião) seria preditivo de que a fonte da planta não transporta o *locus* QTL6 desejado em seu genoma.

[257]Esta etapa de seleção de ácido oléico poderia ser adicionalmente suplementada com seleções genômicas para a presença do *locus* QTL6. Em tal exemplo, a presença do *locus* QTL6 desejado é confirmada detectando-se a presença da inserção do códon TTC na sequência de codificação de ZmDGAT1-2 que resulta na inserção de Phe₄₆₇, Phe₄₆₈, or Phe₄₆₉ na proteína ZmDGAT1-2 (ASK). Isto pode ser alcançado, por exemplo, amplificando-se o fragmento de DNA ao redor deste códon utilizando-se a Id. de Seq. n° 126 e 127, conforme descrito no Exemplo 13 abaixo.

Exemplo 4. Caracterização de Sequência de Quadro de Leitura Aberta em QTL6.

A. DGAT

[258]A Figura 31 mostra o alinhamento da sequência de ácido nucléico da variante de ZmDGAT1-2 de alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico (derivada da linha consanguínea ASK; Id. de Seq. n° 48, codificada por Id. de Seq. n° 47) comparada à sequência ZmDGAT1-2 obtida das linhas consanguíneas de milho de teor de óleo normal Mo17 (Id. de Seq. n° 50, codificada por Id. de Seq. n° 49), EF09B (Id. de Seq. n° 52, codificada por Id. de Seq. n° 51) e b73 (Id. de Seq. n° 54, codificada por Id. de Seq. n° 53). O alinhamento das respectivas sequências de aminoácidos para estas proteínas é mostrado na Figura 30. O alinhamento de sequência de ácido nucléico mostra que

existem os seguintes polimorfismos únicos ao alelo de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico de ZmDGAT1-2 que não são encontrados na sequência correspondente das linhas consangüíneas de milho de teor de óleo normal. A Tabela 3 abaixo resume os polimorfismos identificados na variante de ZmDGAT1-2 de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico (isto é, ZmDGAT1-2 (ASK)) que levam às mudanças de resíduo em ZmDGAT1-2 (ASK).

[259] Conforme pode ser observado a partir do alinhamento da proteína ZmDGAT 1-2 (ASK) com o da proteína DGAT1-2 das linhas consangüíneas de milho de teor de óleo normal (isto é, EF09B, Mo17 e B73), a proteína ZmDGAT 1-2 (ASK) possui uma deleção de glutamina e inserção de fenilalanina em relação à proteína DGAT1-2 de teor de óleo normal. Observe que uma vez que a deleção de glutamina e a inserção da fenilalanina mostradas na Figura 30 ocorre em regiões da proteína DGAT1-2 que compreende resíduos de glutamina em repetição e de fenilalanina em repetição, respectivamente, a deleção e inserção poderia ocorrer em qualquer um dos resíduos de repetição respectivos. Assim, a deleção da glutamina mostrada na Figura 30 aparece na posição correspondente a Gln₆₇ da proteína DGAT1-2 de teor normal de óleo, na realidade, a deleção da glutamina poderia representar uma deleção do resíduo correspondente a to Gln₆₄, Gln₆₅, Gln₆₆, ou Gln₆₇ da DGAT1-2 de teor normal de óleo (por exemplo, EF09B de Id. de Seq. nº 52). De forma similar, embora a inserção de fenilalanina em DGAT1-2 (ASK) mostrada na Figura 30 seja representada por Phe₄₆₉ desta proteína, na realidade, a inserção de fenilalanina em relação à DGAT1-2 poderia ser representada pela

fenilalanina na posição 467, 468 ou 469 da DGAT1-2 (ASK) (ver Id. de Seq. nº 48).

[260]Tabela 3. Locais dos polimorfismos nos ORF de ZmDGAT1-2 da região QTL6 de milho. O identificador de sequência refere-se ao ORF de ZmDGAT1-2 para EF09B (linha consanguínea de milho de teor normal de óleo; Id. de Seq. nº 51). NT, a posição de nucleotídeo no identificador de sequência para EF09B onde um polimorfismo foi identificado no ORF de ZmDGAT1-2 correspondente para ASK (linha consanguínea de milho de alto teor de óleo, alto teor de ácido oléico); “mudança polimórfica” refere-se à substituição, inserção ou deleção específica ocorrendo no ORF de ZmDGAT1-2 correspondente para ASK (Id. de Seq. nº 47); “mudança de resíduo” refere-se à substituição, deleção ou inserção de aminoácido na proteína ZmDGAT1-2 correspondente para ASK (Id. de Seq. nº 48) conforme comparado à sequência de referência EF09B (Id. de Seq. nº 52) como um resultado da mudança polimórfica no ORF de ZmDGAT1-2 para ASK (Id. de Seq. nº 47).

ORF	ID. de SEQ. Nº	NT	Mudança Polimórfica	Mudança de Resíduo
ZmDGAT1-2	51	134	T → G	Val ₄₅ → Gly ₄₅
		163	C → T	Pro ₅₅ → Ser ₅₅

		190-192 ou 193-195 ou 196-198 ou 199-201	deleção de CAG	deleção de Gln ₆₄ * ou deleção de Gln ₆₅ ou deleção de Gln ₆₆ ou deleção de Gln ₆₇
		1401 ou 1404 ou 1407	Inserção de TTC imediatamente após esta posição de nucleotídeo	inserção de → Phe ₄₆₇ ** inserção de → Phe ₄₆₈ inserção de → Phe ₄₆₉

* Proteína ZmDGAT1-2 para ASK (Id. de Seq. nº 48) está sem o resíduo de glutamina correspondente na posição 64, 65, 66 ou 67 da proteína ZmDGAT1-2 para EF09B (Id. de Seq. nº 52), dependendo se a deleção dos três nucleotídeos CAG na sequência de codificação correspondente para a proteína ZmDGAT1-2 para EF09B (Id. de Seq. nº 51) ocorre nos nucleotídeos 190 a 192, 193 a 195, 196 a 198 ou 199 a 201.

** O resíduo de fenilalanina na posição 467, 468 ou 469 da proteína ZmDGAT1-2 para ASK (Id. de Seq. nº 48) representa uma inserção nesta proteína com relação ao local correspondente na proteína ZmDGAT1-2 para EF09B (Id. de Seq. nº 52). Assim, Phe₄₆₇ na sequência ASK corresponderia a uma inserção deste resíduo entre Trp₄₆₇ e Phe₄₆₈ da proteína ZmDGAT1-2 para EF09B (Id. de Seq. nº 52). A Phe₄₆₈ da sequência ASK corresponderia a uma inserção deste resíduo entre Phe₄₆₈ e Phe₄₆₉ da proteína ZmDGAT1-2 para EF09B. A

Phe₄₆₉ da sequência ASK corresponderia a uma inserção deste resíduo entre Phe₄₆₉ e Phe₄₇₀ da proteína ZmDGAT1-2 para EF09B. O local da inserção do resíduo de fenilalanina na sequência ASK dependeria se a mudança polimórfica observada na sequência de codificação ASK (isto é, na inserção TTC) ocorre na posição correspondente ao nucleotídeo 1401, 1404 ou 1407 da sequência de codificação para a proteína ZmDGAT1-2 EF09B de teor normal de óleo (isto é, Id. de Seq. nº 51).

[261] Estes polimorfismos no ORF de ZmDGAT1-2 para ASK podem ser caracterizados pela mudança de resíduo ocorrendo na proteína ZmDGAT1-2 codificada para ARK (Id. de Seq. nº 48) com relação ao resíduo correspondente para a proteína ZmDGAT1-2 para EF09B (Id. de Seq. nº 52) como segue:

1. Polimorfismos de Nucleotídeo Simples

- a. valina na posição 45 da Id. de Seq. nº 52 é substituída com uma glicina na posição 45 de Id. de Seq. nº 48

- b. prolina na posição 55 da Id. de Seq. nº 52 é substituída com uma serina na posição 55 de Id. de Seq. nº 48

2. Deleções

[262] O resíduo de glutamina correspondente ao resíduo de glutamina na posição 64, 65, 66 ou 67 do aminoácido de Id. de Seq. nº 52 é deletado em Id. de Seq. nº 48.

3. Inserções

[263] A proteína ZmDGAT1-2 (ASK) possui uma inserção de um resíduo de fenilalanina em uma posição localizada entre um par de resíduos correspondentes a um par de resíduos em Id. de Seq. nº 52 selecionados entre:

a. o resíduo de triptofano em uma posição 467 do aminoácido de Id. de Seq. nº 52 e o resíduo de fenilalanina a uma posição de aminoácido 468 de Id. de Seq. nº 52; ou

b. o resíduo de fenilalanina na posição de aminoácido 468 de Id. de Seq. nº 52 e o resíduo de fenilalanina na posição de aminoácido 469 de Id. de Seq. nº 52; ou

c. o resíduo de fenilalanina em uma posição de aminoácido 469 de Id. de Seq. nº 52 e o resíduo de serina a uma posição de aminoácido 470 de Id. de Seq. nº 52.

[264]A proteína ZmDGAT1-2 (ASK) (Id. de Seq. nº 48) compreende todas estas quatro mudanças de resíduo. Os polimorfismos únicos ao ORF de ZmDGAT1-2 (Id. de Seq. nº 47, codificando o polipeptídeo de ZmDGAT1-2 (ASK) na Id. de Seq. nº 48) da linha consanguínea de alto teor de óleo, alto teor de ácido oléico ASK podem ser também utilizados na seleção e reprodução assistida por marcador conforme descrito no Exemplo 5 abaixo.

B. Aminoácido Permease 1 (AAP1)

[265]A presente invenção também fornece o quadro de leitura aberta para o polipeptídeo de aminoácido permease 1 (AAP1) de milho (Id. de Seq. nº 56; denominado ZmAAP1) e variantes biologicamente ativas deste conforme definido abaixo. Os polinucleotídeos isolados codificando o polipeptídeo ZmAAP1 são também englobados pela presente invenção. Em uma modalidade, o polinucleotídeo isolado compreende a sequência exposta em Id. de Seq. nº 55 ou variante deste codificando um polipeptídeo AAP1 biologicamente ativo. A Figura 34 mostra um alinhamento do polipeptídeo ZmAAP1 com outros polipeptídeos AAP relacionados de outras espécies de plantas.

C. Proteína de Sistema de Efluxo de K⁺ (PESP)

[266]A presente invenção também fornece o quadro de leitura aberta para a proteína de sistema de efluxo de potássio de milho (Id. de Seq. n° 58; denominada ZmPESP) e variantes biologicamente ativas desta conforme definido abaixo. Os polinucleotídeos isolados codificando o polipeptídeo ZmPESP são também englobados pela presente invenção. Em uma modalidade, o polinucleotídeo isolado compreende a sequência exposta em Id. de Seq. n° 57 ou variante deste codificando um polipeptídeo PESP biologicamente ativo. A Figura 35 mostra um alinhamento do polipeptídeo ZmPESP com outros polipeptídeos PESP relacionados de outras espécies de plantas.

D. Proteína S24 Ribossômica 40S

[267]A presente invenção também fornece o quadro de leitura aberta para a proteína S24 ribossômica 40S de milho (Id. de Seq. n° 60; denominada ZmS24) e variantes biologicamente ativas desta conforme definido abaixo. Os polinucleotídeos isolados codificando o polipeptídeo ZmS24 são também englobados pela presente invenção. Em uma modalidade, o polinucleotídeo isolado compreende a sequência exposta em Id. de Seq. n° 59 ou variante deste codificando uma proteína S24 ribossômica 40S biologicamente ativa. A Figura 36 mostra um alinhamento do polipeptídeo ZmS24 com outras proteínas ribossômicas relacionadas de outras espécies de plantas.

E. Transportador ABC

[268]A presente invenção também fornece o quadro de leitura aberta para o polipeptídeo de transportador ABC tipo PDR (ABCT) de milho (Id. de Seq. n° 64; denominado

ZmABCT (compósito)) e variantes biologicamente ativas deste conforme definido abaixo. Os polinucleotídeos isolados codificando o polipeptídeo ZmABCT (compósito) são também englobados pela presente invenção. Em uma modalidade, o polinucleotídeo isolado compreende a sequência exposta em Id. de Seq. nº 63 ou variante deste codificando um polipeptídeo AAP1 biologicamente ativo.

[269]O comprimento total da sequência de codificação foi construído a partir da sequência de cDNA de ORF parcial de ZmABCT clonada a linha de milho consanguínea Mo17 de teor normal de óleo (sequência exposta na Id. de Seq. nº 61, codificando a sequência de aminoácido N-terminal exposta na Id. de Seq. nº 62) e as sequências EST e genômica para a linha de milho consanguínea B73 de teor normal de óleo. A Figura 37 mostra um alinhamento do polipeptídeo ZmABCT (compósito) com outros polipeptídeos de ABCT relacionados de outras espécies de plantas.

Exemplo 5. Reprodução Assistida por Marcador para QTL6

[270]Este exemplo expõe o uso dos polimorfismos na variante de DGAT de alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico, por exemplo, ZmDGAT1-2 (ASK) da Id. de Seq. nº 47, à medida que os marcadores moleculares aceleram a incorporação do traço de alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico em outro germoplasma com o resultado de aumento de teor de óleo e/ou teor de ácido oléico no cerne, e/ou aumento na proporção de ácido oléico / ácido linoléico no cerne.

[271]A presente invenção fornece um pé de milho com conteúdo de óleo e/ou ácido oléico aumentado no cerne selecionado pelo uso de reprodução assistida por marcador,

onde uma população de plantas é selecionada pela presença de pelo menos uma das seqüências polimórficas únicas à variante de alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico de DGAT. O Exemplo 4, Tabela 3, acima, lista os polimorfismos únicos ao DGAT de alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico.

[272]A seleção de plantas possuindo pelo menos uma das seqüências polimórficas da variante de alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico de DGAT, que está associada com o traço de alto teor de óleo e/ou alto teor de ácido oléico, compreende marcar o DNA genômico da planta resultante, através do processo de seleção, para a presença do polimorfismo. Iniciadores adequados para detecção da presença da variante de alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico são expostos na Id. de Seq. n° 114, 115 e 124 a 127. Por exemplo, o par iniciador exposto como Id. de Seq. n° 124 e 125 amplificará um fragmento que englobe as primeiras três mudanças no N-terminal da proteína DGAT1-2 ASK (nt 134, 163, 199 a 201 na Tabela 3 acima). O par iniciador exposto como Id. de Seq. n° 126 e 127 amplificará um fragmento que inclua a mudança no C-terminal de DGAT1-2 ASK (nt 1408 a 1410 na Tabela 3 acima). As plantas contendo o DGAT de alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico continuam no processo de reprodução e de seleção.

Exemplo 6. Transformação e Regeneração de Pés de Milho Transgênicos

[273]Embriões de milho imaturos de plantas doadoras de estufa são bombardeados com plasmídeos contendo a seqüência de ZmDGAT1-2 (ASK) da Id. de Seq. n° 47, ou a seqüência

ZmDGAT1-2 (EF09B) da Id. de Seq. n° 51, ligada de forma operativa a um promotor de interesse e o gene marcador selecionável PAT (Wohllleben e outros, (1988) *Gene* 70:25-37), que confere resistência ao herbicida Bialafos. Alternativamente, o gene do marcador selecionável é fornecido em um plasmídeo separado. A transformação é executada como segue. Receitas do meio seguem abaixo.

Preparação de Tecido Alvo

[274]As espigas são descascadas e a superfície esterilizada em 30% de água sanitária Clorox mais 0,5% de detergente Micro por 20 minutos e rinsadas duas vezes com água estéril. Os embriões não maduros são extirpados e o eixo do embrião voltado para baixo (escutelo voltado para cima), 25 embriões por placa, em meio 560Y por 4 horas e então alinhados dentro dos 2,5 cm da zona alvo em preparação por bombardeamento.

[275]É produzido um vetor de plasmídeo compreendendo a seqüência ZmDGAT1-2 (ASK) da Id. de Seq. n° 47, ou a seqüência ZmDGAT1-2 (EF09B) da Id. de Seq. n° 51, ligada de forma operativa a um promotor de interesse. Este DNA plasmídeo mais DNA plasmídeo contendo um marcador selecionável PAT é precipitado sobre pelotas de tungstênio de 1,1 micrômetro (diâmetro médio) usando um procedimento de precipitação de CaCl_2 como segue: 100 μL de preparado de partículas de tungstênio em água; 10 μL (1 μg) de DNA em tampão Tris-EDTA (1 μg total de DNA); 100 μL de CaCl_2 2,5 M; e, 10 μL de espermidina 0,1 M.

[276]Cada reagente é adicionado seqüencialmente à suspensão de partículas de tungstênio enquanto a agitação é mantida no centrífugador de vários tubos. A mistura final é

brevemente sonificada e deixada a incubar sob agitação constante por 10 minutos. Após o período de precipitação, os tubos são centrifugados brevemente, o líquido é removido, lavados com 500 mL de etanol 100% e centrifugado por 30 segundos. Novamente o líquido é removido, e 105 µL de etanol a 100% são adicionados à pelota da partícula de tungstênio final. Para bombardeamento por pistola de partículas, as partículas de tungstênio/DNA são brevemente "sonicadas" e são coradas com 10 µL sobre o centro de cada macrotransportador e deixadas a secar por cerca de 2 minutos antes do bombardeamento.

[277]As placas de amostra são bombardeadas no nível #4 em uma pistola de partículas. Todas as amostras recebem um único disparo a 4,48 MPa, com um total de dez alíquotas tiradas de cada tubo de partículas preparadas/DNA.

[278]Seguindo o bombardeamento, os embriões são mantidos em meio 560Y por 2 dias, e então transferidos a meio de seleção 560R contendo 3 mg/litro de Bialafos e subcultivados a cada 2 semanas. Após aproximadamente 10 semanas de seleção, os clones de calos resistentes à seleção são transferidos a meio 288J para iniciar uma regeneração de planta. Seguindo a maturação do embrião somático (2 a 4 semanas), embriões somáticos bem desenvolvidos são transferidos ao meio para germinação e transferidos ao ambiente de cultura iluminado. Aproximadamente 7 a 10 dias após, plântulas em desenvolvimento são transferidas a meio livre de hormônio 272V em tubos por 7 a 10 dias até que as plântulas estejam bem estabelecidas. As plantas são então transferidas para inserção em superfícies (equivalentes a recipiente de 6,35

cm) contendo terra e foram crescidas por 1 semana em uma câmara de desenvolvimento, um crescimento subsequente adicional por 1 a 2 semanas na estufa, e então transferidas a 600 recipientes clássicos (6,07 litros) e deixadas a crescer até maturidade. As plantas são monitoradas e registradas quanto ao seu conteúdo de óleo e conteúdo de ácido oléico.

[279]O meio de bombardeamento (560Y) compreende 4,0 g/L de sais basais N6 (SIGMA C-1416), 1,0 mL/L de Mistura reacional de vitamina de Eriksson (1000X SIGMA-1511), 0,5 mg/L de HCl tiamina, 120,0 g/L sucrose, 1,0 mg/L de 2,4-D e 2,88 g/L de L-prolina (levado ao volume com D-I H₂O seguindo ajuste ao pH 5,8 com KOH); 2,0 g/L de Gelrite (adicionado após avolumação com D-I H₂O); e 8,5 mg/L nitrato de prata (adicionado após esterilizar o meio e resfriar à temperatura ambiente). O meio de seleção (560R) compreende 4,0 g/L de sais basais N6 (SIGMA C-1416), 1,0 mL/L de Mistura reacional de vitamina de Eriksson (1000X SIGMA-1511), 0,5 mg/L de HCl tiamina, 30,0 g/L sucrose e 2,0 mg/L de 2,4-D e 2,88 g/L de L-prolina (levado ao volume com D-I H₂O seguindo ajuste ao pH 5,8 com KOH); 3,0 g/L de Gelrite (adicionado após avolumação com D-I H₂O); e 0,85 mg/L nitrato de prata e 3,0 mg/L de bialafos (ambos adicionados após esterilizar o meio e resfriar à temperatura ambiente).

[280]O meio de regeneração de planta (288J) compreende 4,3 g/L de sais MS (GIBCO 11117-074), 5,0 mL/L de solução comum de vitaminas MS (0,100 g de ácido nicotínico, 0,02 g/L HCl tiamina, 0,10 g/L de HCl piridoxina e 0,40 g/L de glicina avolumados com D-I H₂O polido) (Murashige and Skoog

(1962) *Physiol. Plant.* 15:473), 100 mg/L de mio-inositol, 0,5 mg/L zeatina, 60 g/L de sucrose, e 1,0 mL/L de ácido abscísico 0,1 mM (avolumado com D-I H₂O polido após ajuste ao pH 5,6); 3.0 g/L de Gelrite (adicionado após avolumação com D-I H₂O); e 1.0 mg/L ácido indoleacético e 3,0 mg/L de bialafos (adicionado após esterilizar o meio e resfriamento a 60°C). O meio livre de hormônio (272V) compreende 4,3 g/L de sais MS (GIBCO 11117-074), 5,0 mL/L de solução comum de vitaminas MS (0,100 g de ácido nicotínico, 0,02 g/L HCl tiamina, 0,10 g/L de HCl piridoxina e 0,40 g/L de glicina avolumados com D-I H₂O polido), 0,1 g/L de mio-inositol, e 40,0 g/L de sucrose (avolumados com D-I H₂O polido após ajuste ao pH 5,6); e 6.0 g/L de bacto-agar (adicionado após avolumação com D-I H₂O), esterilizado e resfriado a 60°C.

Exemplo 7. Transformação de Milho mediada por *Agrobacterium*

[281]Para a transformação de milho mediada por *Agrobacterium* com uma sequência ZmDGAT1-2 (ASK) de Id. de Seq. n° 47 ou uma sequência ZmDGAT1-2 (EF09B) de Id. de Seq. n° 51, o método de Zhao é empregado (Patente U.S. de número 5.981.840, e publicação de patente PCT WO98/32326; os conteúdos das quais estão aqui incorporados por referência). De forma breve, embriões imaturos são isolados do milho e os embriões contatados com uma suspensão de *Agrobacterium*, onde as bactérias são capazes de transferir a sequência ZmDGAT1-2 (ASK) de Id. de Seq. n° 47, ou ZmDGAT1-2 (EF09B) de Id. de Seq. n° 51, ligada de forma operativa a um promotor de interesse a pelo menos uma célula de pelo menos um dos embriões imaturos (etapa 1: etapa de infecção). Nesta etapa, os embriões imaturos são

imersos em uma suspensão de *Agrobacterium* para a iniciação de inoculação. Os embriões são co-cultivados por um tempo com o *Agrobacterium* (etapa 2: etapa de co-cultivação). Os embriões imaturos são cultivados em meio sólido após a etapa de infecção. Após este período de co-cultivação uma etapa de "descanso" opcional é considerada. Nesta etapa de descanso, os embriões são incubados na presença de pelo um antibiótico conhecido para inibir o desenvolvimento de *Agrobacterium* sem a adição de um agente seletivo para transformantes de planta (etapa 3: etapa de descanso). Os embriões imaturos são cultivados em meio sólido com antibiótico, mas sem um agente de seleção, para eliminação de *Agrobacterium* e para uma fase de descanso para as células infectadas. A seguir, os embriões inoculados são cultivados em meio contendo um agente seletivo e calos transformados em desenvolvimento são recuperados (etapa 4: etapa de seleção). Os embriões imaturos são cultivados em meio sólido com um agente seletivo resultando no desenvolvimento seletivo de células transformadas. O calo é então regenerado em plantas (etapa 5: etapa de regeneração), e preferivelmente, os calos desenvolvidos em meio seletivo são cultivados em meio sólido para regenerar plantas.

Exemplo 8. Transformação do Embrião de Soja

A. Condições de Cultivo

[282] Culturas de suspensão embriogênicas de soja (cv. Jack) são mantidas em 35 mL de meio líquido SB 196 (ver receitas abaixo) em um agitador rotativo, 150 RPM, 26°C com luzes fluorescentes brancas frias em fotoperíodo de 16:8 h dia/noite a intensidade de luz de 60 a 85 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Os

cultivos são sub-cultivados a cada 7 dias a duas semanas inoculando-se aproximadamente 35 mg de tecido em 35 mL de SB196 líquido fresco (o intervalo de sub-cultivo preferido é a cada 7 dias).

[283]Os cultivos de suspensão embriogênica de soja são transformados com os plasmídeos e fragmentos de DNA descritos nos seguintes exemplos pelo método de bombardeio por pistola de partículas (Klein e outros, (1987) *Nature* 327:70).

B. Iniciação de Cultivo de Suspensão Embriogênica de Soja

[284]Os cultivos de soja são iniciados duas vezes a cada mês com 5 a 7 dias entre cada iniciação.

[285]Vagens com sementes imaturas de pés de soja disponíveis após 45 a 55 dias de plantio foram escolhidas, removidas de suas cascas e colocadas em uma caixa magenta esterilizada. As sementes de soja são esterilizadas agitando-as por 15 minutos em solução de Clorox a 5% com 1 gota de sabão marfim (95 mL de água destilada autoclavada mais 5 mL de Clorox e 1 gota de sabão). Misturar bem. As sementes são rinsadas utilizando-se 2 garrafas de 1 litro de água destilada esterilizada e destas menos de 4 mm são colocadas em lâminas de microscópio individuais. A pequena extremidade das sementes é cortada e os cotilédones pressionados para fora do revestimento da semente. Os cotilédones são transferidos a placas contendo meio SB1 (25 a 30 cotilédones por placa). As placas são embrulhadas com fita de fibra e armazenadas por 8 semanas. Após este período embriões secundários são cortados e colocados em meios líquidos SB 196 por 7 dias.

C. Preparação de DNA por Bombardeamento

[286]Um plasmídeo intacto ou um fragmento de plasmídeo de DNA contendo os genes de interesse o gene marcador selecionável são utilizados para bombardeamento. O DNA de plasmídeo para bombardeamento é rotineiramente preparado e purificado utilizando-se métodos descritos nos Protocolos e Guia de Aplicações Promega™, Segunda Edição (página 106). Fragmentos dos plasmídeos transportando a sequência ZmDGAT1-2 (ASK) da Id. de Seq. nº 47, ou a sequência ZmDGAT1-2 (EF09B) da Id. de Seq. nº 51, ligada de forma operativa a um promotor de interesse são obtidos por isolamento com gel de plasmídeos duplamente digeridos. Em cada caso, 100 µg de DNA de plasmídeos são digeridos em 0,5 mL da mistura de enzima específica que é apropriada para o plasmídeo de interesse. Os fragmentos de DNA resultantes são separados por eletroforese em gel em agarose GTG SeaPlaque a 1% (BioWhitaker Molecular Applications) e os fragmentos de DNA contendo a sequência ZmDGAT1-2 (ASK) de Id. de Seq. nº 47, ou a sequência ZmDGAT1-2 (EF09B) de Id. de Seq. nº 51, ligada de forma operativa a um promotor de interesse são cortados do gel de agarose. O DNA é purificado da agarose utilizando-se a enzima digestiva GELase seguindo-se o protocolo do fabricante.

[287]Uma alíquota de 50 µL de água destilada estéril contendo 3 mg de partículas de ouro (3 mg de ouro) é adicionada a 5 µL de uma solução de DNA de 1 µg/µL (seja plasmídeo intacto ou fragmento de DNA preparado como descrito acima), 50 µL de CaCl₂ 2,5 M e 20 µL de espermidina a 0,1 M. A mistura é agitada por 3 minutos no nível 3 de um agitador de vórtice e girada por 10 segundos

em uma centrífuga de mesa. Após uma lavagem com 400 μL de etanol a 100% a pelota é suspensa por sonicação em 40 μL de etanol a 100%. Cinco μL de suspensão de DNA são dispensados em cada disco voador do instrumento Biolistic PDS1000/HE. Cada alíquota de 5 μL contém aproximadamente 0,375 mg de ouro por bombardeio (ou seja, por disco).

D. Preparação de Tecido e Bombardeio com DNA

[288]Aproximadamente 150 a 200 mg de cultivos de suspensão embriônica com 7 dias são colocados em uma placa de Petri de 60 x 15 mm estéril vazia e a placa é coberta com uma malha de plástico. O tecido é bombardeado com 1 a 2 disparos por placa com pressão de ruptura de membrana ajustada a 7,58 MPa e a câmara evacuada a um vácuo de 91,43 KPa a 94,82 KPa. O tecido é colocado a aproximadamente 8,9 cm da tela de retenção.

E. Seleção de Embriões Transformados

[289]Os embriões transformados são selecionados ou utilizando-se higromicina (quando o gene da higromicina fosfotransferase, HPT, é utilizado como um marcador selecionável) ou clorsulfurona (quando o gene da acetolactato sintase, ALS, é utilizado como o marcador selecionável).

F. Seleção por Higromicina (HPT)

[290]Após o bombardeio, o tecido é colocado em meio SB 196 fresco e cultivado conforme descrito acima. Seis dias após o bombardeio, o SB 196 é trocado por SB 196 fresco contendo um agente de seleção de higromicina a 30 mg/L. Este meio de seleção é renovado semanalmente. Quatro a seis semanas pós-bombardeamento, um tecido transformado verde pode ser observado desenvolvendo-se a partir de grupos

embrionários necróticos não transformados. O tecido verde isolado é removido e inoculado em placas de multicavidades para gerar novas culturas em suspensão embrionárias transformadas, propagadas de forma clonal.

G. Seleção por Clorsulfurona (ALS)

[291]Após o bombardeio, o tecido é dividido entre 2 frascos com meio SB 196 fresco e cultivado conforme descrito acima. Seis a sete dias após o bombardeio, o SB 196 é trocado por SB 196 fresco contendo um agente de seleção de clorsulfurona a 100 ng/mL. Este meio de seleção é renovado semanalmente. Quatro a seis semanas pós-bombardeamento, um tecido transformado verde pode ser observado desenvolvendo-se a partir de grupos embrionários necróticos não transformados. O tecido verde isolado é removido e inoculado em placas de multicavidades contendo SB 196 para gerar novas culturas em suspensão embrionárias transformadas, propagadas de forma clonal.

H. Regeneração de Embriões Somáticos de Soja em Plantas

[292]A fim de se obter plantas completas a partir de cultivos de suspensão embrionária, o tecido deve ser regenerado.

I. Maturação do Embrião

[293]Os embriões são cultivados por 4 a 6 semanas a 26°C em SB 196 sob lâmpadas (40 watts) fluorescentes brancas frias (Phillips cool white Econowatt F40/CW/RS/EW) e Agro (Phillips F40 Agro) em um fotoperíodo de 16:8 h com intensidade de luz de 90 a 120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Após este período os grupos de embriões são removidos para um meio de agar sólido, SB 166, por 1 a 2 semanas. Os grupos são então

subcultivados a um meio SB 103 por 3 semanas. Durante esse período, embriões individuais podem ser removidos dos grupos e selecionados pelo fenótipo de alto teor de óleo / alto teor de ácido oléico associado com a presença de ZmDGAT1-2 (ASK), ou conteúdo de óleo aumentado e/ou conteúdo de ácido oléico aumentado e/ou proporção de ácido oléico/ácido linoléico aumentada devido a superexpressão de ZmDGAT1-2 (EF09B) de teor normal de óleo. Deve ser observado que qualquer fenótipo detectável, resultando da expressão dos genes de interesse poderia ser selecionado neste estágio.

J. Dessecação e Germinação de Embrião

[294] Os embriões individuais amadurecidos são dessecados colocando-os em uma pequena placa de petri (35x10 mm) por aproximadamente 4 a 7 dias. As placas são seladas com fita de fibra (criando uma pequena câmara de umidade). Os embriões dessecados são plantados em meio SB71-4 onde eles são deixados para germinar sob as mesmas condições de cultura descritas acima. As plântulas germinadas são removidas do meio de germinação e rinsadas completamente com água e então plantadas em Redi-Earth em bandeja de 24 células, cobertas com domos de plástico transparente. Após 2 semanas o domo é removido e as plantas enrijecem por uma semana adicional. Se as plântulas aparentarem estar fortes elas são transplantadas a vasos de 25,4 cm com Redi-Earth com até 3 plântulas por vaso. Após 10 a 16 semanas, as sementes maduras são colhidas, cortadas e analisadas quanto a proteínas.

K. Receitas de Meios

1. SB 196 - Meio de proliferação líquido FN Lite (por

litro)

MS FeEDTA - 100x estoque 1	10 ml
Sulfato MS - 100x estoque 2	10 ml
FN Lite Halides - 100x estoque 3	10 ml
FN Lite P,B,Mo - 100x estoque 4	10 ml
Vitaminas B5 (1 mL/L)	1,0 ml
2,4-D (10 mg/L concentração final)	1,0 ml
KNO ₃	2,83 gm
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,463 gm
Asparagina	1,0 gm
Sucrose (1%)	10 gm
pH 5,8	

Soluções Estoque FN Lite

Estoque #	MS Fe EDTA 100x Estoque	1000 mL	500 mL
	Na ₂ EDTA*	3,724 g	1,862 g
	FeSO ₄ - 7H ₂ O	2,784 g	1,392 g
	* Adicionar primeiro, dissolver em garrafa escura durante agitação		
2	MS Sulfato 100x estoque		
	MgSO ₄ -7H ₂ O	37,0 g	18,5 g
	MnSO ₄ -H ₂ O	1,69 g	0,845 g
	ZnSO ₄ -7H ₂ O	0,86 g	0,43 g
	CuSO ₄ -5H ₂ O	0,0025 g	0,00125 g

Haletos FN Lite 100x Estoque

CaCl ₂ -2H ₂ O	30,0 g	15,0 g
KI	0,083 g	0,0715 g
CoCl ₂ - 6H ₂ O	0,0025 g	0,00125 g

FN Lite P,B,Mo 100x Estoque

KH ₂ PO ₄	18,5 g	9,25 g
---------------------------------	--------	--------

H ₃ BO ₃	0,62 g	0,31 g
Na ₂ MoO ₄ - 2H ₂ O	0,025 g	0,0125 g

[295]Meio sólido SB1 (por litro) compreende: 1 Pct. de Sais MS (Gibco / BRL - N° de Cat. 11117-066); 1 mL de vitaminas B5 1.000x estoque; 31,5 g sucrose; 2 mL 2,4-D (20 mg/L de concentração final); pH 5,7 e 8 g de TC agar.

[296]Meio sólido SB 166 (por litro) compreende: 1 Pct. de Sais MS (Gibco / BRL - N° de Cat. 11117-066); 1 mL de vitaminas B5 1.000x estoque; 60 g maltose; 750 mg de hexahidrato de MgCl₂; 5 g de carvão ativado; pH 5,7 e 2 g de Gelrite.

[297]Meio sólido SB 103 (por litro) compreende: 1 Pct. de Sais MS (Gibco / BRL - N° de Cat. 11117-066); 1 mL de vitaminas B5 1.000x estoque; 60 g maltose; 750 mg de hexahidrato de MgCl₂; pH 5,7 e 2 g de Gelrite.

[298]Meio sólido SB 71-4 (por litro) compreende: 1 garrafa de sais B5 Gamborg com sucrose (Gibco / BRL - N° de Cat. 21153-036); pH 5,7; e 5 g de TC agar.

[299]2,4-D de estoque é obtido pré-pronto de Phytotech, n° de cat. D 295 - concentração é de 1 mg/mL.

[300]Vitaminas B5 de estoque (por 100 mL) que é armazenada em alíquotas a -20°C compreende: 10 g de mioinositol; 100 mg de ácido nicotínico; 100 mg de piridoxina HCl; e 1 g de tiamina. Se a solução não dissolver rápido o suficiente, aplicar um nível baixo de calor através da placa de agitação a quente. A clorsulfurona de estoque compreende 1 mg/mL em hidróxido de amônio 0,01 N.

Exemplo 9. Identificadores de Sequencia

[301]A Tabela 4 fornece um resumo dos identificadores

de sequência para os loci marcadores e sequências associadas aqui mencionadas.

Tabela 4

Resumo de Identificadores de Sequência

Id. de Seq. nº	Descrição
1	Sequência de marcador para BAC05-ASK
2	Sequência de marcador para BAC05-EF09B
3	Sequência de marcador para BAC17-ASK
4	Sequência de marcador para BAC17-EF09B
5	Sequência de marcador para BAC18-ASK
6	Sequência de marcador para BAC18-EF09B
7	Sequência de marcador para BAC20-ASK
8	Sequência de marcador para BAC20-EF09B
9	Sequência de marcador para BAC22-ASK
10	Sequência de marcador para BAC22-EF09B
11	Sequência de marcador para BAC24-ASK
12	Sequência de marcador para BAC24-EF09B
13	Sequência de marcador para BAC29-ASK
14	Sequência de marcador para BAC29-EF09B
15	Sequência de marcador para BAC32-ASK
16	Sequência de marcador para BAC32-EF09B
17	Sequência de marcador para QTL6SNP7-ASK
18	Sequência de marcador para QTL6SNP7-EF09B
19	Sequência de marcador para QTL6SNP8-ASK
20	Sequência de marcador para QTL6SNP8-EF09B
21	Sequência de marcador para QTL6SNP9-ASK
22	Sequência de marcador para QTL6SNP9-EF09B
23	Sequência de marcador para QTL6SNP13-ASK
24	Sequência de marcador para QTL6SNP13-EF09B

25	Seqüência de marcador para QTL6SNP14-ASK
26	Seqüência de marcador para QTL6SNP14-EF09B
27	Seqüência de marcador para QTL6SNP15-ASK
28	Seqüência de marcador para QTL6SNP15-EF09B
29	Seqüência de marcador para QTL6SNP16-ASK
30	Seqüência de marcador para QTL6SNP16-EF09B
31	Seqüência de marcador para QTL6SNP17-ASK
32	Seqüência de marcador para QTL6SNP17-EF09B
33	Seqüência de marcador para MZA5002-ASK
34	Seqüência de marcador para MZA5002-EF09B
35	Seqüência de marcador para MZA13321 -ASK
36	Seqüência de marcador para MZA13321-EF09B (parcial)
37	Seqüência de marcador para MZA15785-ASK
38	Seqüência de marcador para MZA15785-EF09B
39	Seqüência de marcador para MZA13118-ASK
40	Seqüência de marcador para MZA13118-EF09B
41	Seqüência de marcador para MZA11771-ASK
42	Seqüência de marcador para MZA11771-EF09B
43	Seqüência de marcador para MZA9351-ASK
44	Seqüência de marcador para MZA9351-EF09B (parcial)
45	Seqüência de marcador para MZA8135-ASK
46	Seqüência de marcador para MZA8135-EF09B
47	ZmDGAT1-2 cDNA ASK - seqüência de nucleotídeo
48	ZmDGAT1-2 ASK - seqüência de aminoácido
49	ZmDGAT1-2 cDNA Mo 17 - seqüência de nucleotídeo

50	ZmDGAT1-2 Mo 17 - sequência de aminoácido
51	ZmDGAT1-2 cDNA EF09B - sequência de nucleotídeo
52	ZmDGAT1-2 EF09B - sequência de aminoácido
53	ZmDGAT1-2 cDNA B73 - sequência de nucleotídeo
54	ZmDGAT1-2 B73 - sequência de aminoácido
55	ZmAAP1 (aminoácido permease) (Mo 17) - sequência de nucleotídeo
56	ZmAAP1 (aminoácido permease) (Mo 17) - sequência de aminoácido
57	ZmPESP (proteína de sistema de afluxo de K+) (Mo 17) - sequência de nucleotídeo
58	ZmPESP (proteína de sistema de afluxo de K+) (Mo 17) - sequência de aminoácido
59	ZmS24 (proteína S24 ribossômica 40S) (Mo 17) - sequência de nucleotídeo
60	ZmS24 (proteína S24 ribossômica 40S) (Mo 17) - sequência de aminoácido
61	ZmABCT (Transportador ABC tipo PDR) (Mo 17) - sequência de nucleotídeo parcial de extremidade 5'
62	ZmABCT (Transportador ABC tipo PDR) (Mo 17)- sequência de aminoácido N-terminal
63	ZmABCT (Transportador ABC tipo PDR) compósito de Mo 17, B73 genômico e EST - sequência de nucleotídeo
64	ZmABCT (Transportador ABC tipo PDR) compósito de Mo 17, B73 genômico e EST -

	seqüência de aminoácido
65	Lee 1 con - aminoácido
66	Lee 1 milho - nucleotídeo
67	Lee 1 milho - aminoácido
68	Iniciador de avanço BAC05 (86488)
69	Iniciador reverso BAC05 (86489)
70	Iniciador de avanço BAC17 86512
71	Iniciador reverso BAC17 86513
72	Iniciador de avanço BAC18 (86514)
73	Iniciador reverso BAC18 (86515)
74	Iniciador de avanço BAC20 (86518)
75	Iniciador reverso BAC20 (86519)
76	Iniciador de avanço BAC22 (86522)
77	Iniciador reverso BAC22 (86523)
78	Iniciador de avanço BAC24 (86526)
79	Iniciador reverso BAC24 (86527)
80	Iniciador de avanço BAC29 (86536)
81	Iniciador reverso BAC29 (86537)
82	Iniciador de avanço BAC32 (86542)
83	Iniciador reverso BAC32 (86543)
84	Iniciador de avanço QTL6SNP7 (96066)
85	Iniciador reverso QTL6SNP7 (96067)
86	Iniciador de avanço QTL6SNP8 (96068)
87	Iniciador reverso QTL6SNP8 (96069)
88	Iniciador de avanço QTL6SNP9 (96070)
89	Iniciador reverso QTL6SNP9 (96071)
90	Iniciador de avanço QTL6SNP13 (96080)
91	Iniciador reverso QTL6SNP13 (96081)
92	Iniciador de avanço QTL6SNP14 (96082)

93	Iniciador reverso QTL6SNP14 (96083)
94	Iniciador de avanço QTL6SNP15 (96084)
95	Iniciador reverso QTL6SNP15 (96085)
96	Iniciador de avanço QTL6SNP16 (96086)
97	Iniciador reverso QTL6SNP16 (96087)
98	Iniciador de avanço QTL6SNP17 (96088)
99	Iniciador reverso QTL6SNP17 (96089)
100	Iniciador de avanço MZA5002 (82263)
101	Iniciador reverso MZA5002 (82264)
102	Iniciador de avanço MZA13321 (82328)
103	Iniciador reverso MZA13321 (82329)
104	Iniciador de avanço MZA15785 (82326)
105	Iniciador reverso MZA15785 (82327)
106	Iniciador de avanço MZA13118 (82324)
107	Iniciador reverso MZA13118 (82325)
108	Iniciador de avanço MZA11771 (82314)
109	Iniciador reverso MZA11771 (82315)
110	Iniciador de avanço MZA9351 (82334)
111	Iniciador reverso MZA9351 (82335)
112	Iniciador de avanço MZA8135 (82336)
113	Iniciador reverso MZA8135 (82337)
114	Iniciador de avanço DGAT1-2 ASK (94784)
115	Iniciador reverso DGAT1-2 ASK (94785)
116	263762-bp genomic fragment (Mo 17)
117	11915-bp genomic fragment (Mo 17)
118	6369-bp genomic fragment (Mo 17)
119	Complementary strand to ZmDGAT1-2 (Mo17) promoter
120	ZmAAP1 promoter

121	ZmPESP(Mol7) promoter
122	ZmS24 promoter
123	ZmABCT promoter
124	Iniciador de avanço DGAT1-2 ASK
125	Iniciador reverso DGAT1-2 ASK
126	Iniciador de avanço DGAT1-2 ASK
127	Iniciador reverso DGAT1-2 ASK
128	seqüência genômica ASKC28IB1 de 82725-bp
129	promotor ZmPESP(ASK)
130	filamento complementar ao promotor de ZmDGAT1-2(ASK)
131	seqüência de codificação ZmFAD2-1
132	seqüência de aminoácido ZmFAD2-1
133	seqüência de polinucleotídeo inibidora de FAD2

Exemplo 10: Mapeamento Final de QTL6 a um Único Gene (DGAT1-2)

[302] Para mapear a QTL6 até um único gene, novos marcadores SNP foram desenvolvidos a partir de 3 seqüências de clone de BAC e utilizados para genotipar aproximadamente 4.000 mudas de BC5S1 segregando QTL6. Os dados de óleo e ácido oléico foram obtidos a partir de 14 recombinantes críticos. OS dados mostram que a QTL6 está localizada entre BAC 17 e BAC 22, uma região de aproximadamente 5,0 kb, contendo a seqüência de codificação para a metade de C-terminal de DGAT1-2 (4050 bp; codificando aminoácidos 196 a 495), o 3' UTR (409 bp), e possivelmente a região terminal (542 bp) de DGAT1-2 (Figura 40). Desta forma, a QTL6 foi mapeada a uma região em um único gene, DGAT1-2. Os dados

também mostram que esta região controle tanto as concentrações de óleo quanto de ácido oléico do embrião uma vez que nenhuma segregação entre fenótipos de alto teor de óleo e alto teor de ácido oléico foi observada neste intervalo.

[303]Conforme mostrado na Tabela 3 acima, há apenas 4 mudanças de aminoácido em DGAT1-2 do alelo de alto teor de óleo, alto teor de ácido oléico ASK (isto é, ZmDGAT1-2 (ASK) mostrado na Id. de Seq. n° 48) quando comparado ao DGAT1-2 do alelo de teor de óleo normal (isto é, ZmDGAT1-2 (EF09B) mostrado em Id. de Seq. n° 52). Estas mudanças incluem a substituição Val₄₅ → Gly₄₅; a substituição Pro₅₅ → Ser₅₅; deleção do resíduo de glutamina correspondendo a Gln₆₄ ou Gln₆₅ ou Gln₆₆ ou Gln₆₇ de DGAT1-2 do alelo EF09B; e a inserção de Phe₄₆₇ ou Phe₄₆₈ ou Phe₄₆₉ em DGAT1-2 do alelo de alto teor de óleo ASK. Na posição de mapeamento final de QTL6 (entre Bac 17 e Bac 22), a inserção Phe₄₆₇ ou Phe₄₆₈ ou Phe₄₆₉ em DGAT1-2 do alelo ASK é a única mudança de aminoácido entre os dois parentes de mapeamento (ilustrados como inserção Phe₄₆₉ (/469F) na Figura 40). Isto sugere que o polimorfismo no alelo de alto teor de óleo, alto teor de ácido oléico ASK que resulta na inserção de Phe₄₆₇ ou Phe₄₆₈ ou Phe₄₆₉ em DGAT1-2 do alelo ASK desempenha um papel crucial em aumentar o conteúdo de óleo e ácido oléico.

Exemplo 11: Conformação de QTL6 em Milho Transgênico

[304]O resultado do mapeamento fino descrito no Exemplo 10 acima foi conformado no milho transgênico. As construções contendo promotor de oleosina 16-kD de embrião preferido guiando a expressão do alelo ASKC28IB1 (chamado de ASK; Id. de Seq. n° 47) ou EF09B (Id. de Seq. n° 51) do

cDNA DGAT1-2 foram transformadas em milho por infecção de *Agrobacterium*. As construções também continham um DS-RED direcionado por um promotor de proteína 2 de transferência de lipídio específico de aleurona (LTP2) para facilitar a segregação de cernes transgênicos e nulos para análise fenotípica. Os dados de óleo e perfis de ácidos graxos foram obtidos de cernes T1 segregados.

[305]Em média, a superexpressão do alelo ASK leva a um aumento de 27%, 26% e 80% na concentração de óleo do embrião, na concentração de óleo da semente e concentração de ácido oléico, e um decréscimo de 28% nas concentrações de ácido linoléico, cerca de 2 a 3 vezes os efeitos causados pelo alelo EF09B (Figura 41). Os aumentos causados pela superexpressão do alelo ASK foram também mais significantes que aqueles causados pelo alelo ASKC28IB1 nativo observado em BC4S2 NILs (Figure 41). Os cernes transgênicos superexpressando o alelo EF09B de DGAT1-2 também apresentaram mudanças em todos os quatro traços. DGAT catalisa a etapa final em biossíntese de óleo e tem sido implicada como a taxa que limita a etapa. Sem estar preso por qualquer teoria ou mecanismo de ação, a superexpressão do alelo EF09B de DGAT1-2 provavelmente supera esta etapa limitante de taxa levando a mudanças nestes quatro traços de óleo.

[306]Juntos, estes dados indicam que DGAT1-2 é o genél causador para QTL6 e é responsável pelos conteúdos aumentados de óleo e ácido oléico no milho.

Exemplo 12: DGAT 1-2 e inserção de resíduo de fenilalanina crítico confirmado com Gene QTL6 em levedura

[307]Conforme notado acima, o resíduo extra de

fenilalanina localizado na posição 469 da proteína DGAT1-2 para o alelo ASKC28IB1 (isto é, Phe₄₆₉ de Id. de Seq. n°:48, também referido como F469) quando alinhado com a proteína DGAT 1-2 com teor normal de óleo para o alelo EF09B (ver Figura 30B) pode representar o resultado de uma inserção deste resíduo entre os pares seguintes de resíduos na proteína DGAT 1-2 com teor normal de óleo correspondente (Id. de Seq. n°:52) para o alelo EF09B entre Trp₄₆₇ e Phe₄₆₈ de Id. de Seq. n°:52, entre Phe₄₆₈ e Phe₄₆₉ de Id. de Seq. n°:2 ou entre Phe₄₆₉ e Ser₄₇₀ de Id. de Seq. n°:2. Para determinar se a inserção representada pelo resíduo na posição 467, 468, or 469 da proteína DGAT1-2 para o alelo ASKC28IB1 é responsável pelos fenótipos de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico, as atividade enzimáticas de DGAT 1-2 a partir de diferentes alelos de DGAT 1-2 foi medida em levedura.

[308]Uma cepa de deleção *Saccharomyces cerevisiae* *DGA1* (DGAT) (Id. de clone 12501) foi adquirida a partir de Invitrogen e usada para criar um mutante duplo (AyDGAT, AyPDAT) deficiente na biossíntese de TAG pela remoção do gene *LRO1* (fosfolipídeo:diacilglicerol aciltransferase, ou PDAT) usando-se recombinação homóloga. O alelo ASKC28IB1 ou ORF de EF09B (ZmDGAT 1-2(ASK) de Id. de Seq. n°:47 e ORF de ZmDGAT 1-2(EF09B) de Id. de Seq. n°:51, respectivamente) ou suas formas mutantes (ORF de ZmDGAT 1-2(ASK) com o códon TTC nas posições nt 1405-1407 deletadas, codificando o ZmDGAT 1-2(ASK) mutante possuindo a sequência exposta em Id. de Seq. n°:48 com o resíduo Phe₄₆₉ deletado; e OFR de ZmDGAT 1-2(EF09B) com um códon de TTC inserido imediatamente depois de nt 1407 Id. de Seq. n°:51, encoding

o ZmDGAT 1-2 (EF09B) mutante possuindo a sequência exposta em Id. de Seq. n°:52 com uma inserção do resíduo de fenilalanina entre Phe₄₆₉ e Ser₄₇₀ de Id. de Seq. n°:52) foram clonado em PTS416 (*Stratagene*) contendo um promotor de 1.0 kb e um finalizador de 0,5 kb a partir de *S. cerevisiae* 3-fosfoglicerato quinase (PGK1). Os plasmídeos resultantes e vetor apenas foram usados para transformar o mutante duplo de levedura.

[309]A quantidade de Tag nas células transformadas foi determinada. Resumidamente, 20 mL de meio de crescimento de cultura de levedura para 54 horas foram colhidos. Lipases foram inativadas pelo aquecimento a 80°C por 10 minutos na presença de 1 mL de isopropanol. As células foram lisadas por vórtice na presença de 0,5 mL de contas de vidro e 0,5 mL de ácido acético 0,15 M. Como um controle interno, 50 µg de TAG (C17:0) foram adicionados a cada amostra. Os lipídeos totais foram extraídos com 3 mL de tampão de extração (clorofórmio:metanol=2:1), lavado com 1,5 mL de clorofórmio. A fase orgânica foi combinada e seca sob corrente de nitrogênio, então dissolvida em 100 µL de clorofórmio. Metade das amostras (50 µL) foram carregadas sobre placas de TLC, desenvolvidas com hexano/éter/ácido acético (70:30:1) e seguidas por um breve tingimento com vapor de iodo. As faixas correspondentes foram raspadas para análise com GC similar aquela descrita acima. Os conteúdos totais de TAG foram calculados com base na soma de valores experimentais para C16:0, C16:1, C18:0, e C18:1.

[310]O método de Milcamps e outros (2005) *J. Biol. Chem.* 280:5370-5377 foi seguido com menores mudanças para preparação de proteína microsoma. Culturas de levedura

forma desenvolvidas para começar a fase estacionária em meio de SC menos uracila. Seguindo-se a colheita, as pelotas de levedura foram ressuspensas em 4 mL de 20 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5% glicerol, 1 mM DTT, e 0,3 M (NH₄)₂SO₄. 2 mL de contas de vidro foram adicionados, e células foram lisadas por vórtice por 5 minutos. O lisato foi centrifugado por 15 min a 1500 g a 6°C. O sobrenadante foi então centrifugado a 100.000 g por 1,5 h a 6°C. O pelete microsomal foi ressuspenso em 500 µL de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,2 contendo 10% de glicerol e foi congelado em nitrogênio líquido antes da armazenagem a -80°C. As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Bradford, usando-se o reagente Coomassie Plus (Pierce), com albumina bovina sérica como um padrão.

[311] Os ensaios de DGAT foram feitos por 1 min a 25°C, com fosfato de potássio 50 mM pH 7,2, oleoil-coenzima A marcada com 1-¹⁴C 10 µM (50 mCi/mmol, Perkin Elmer), e 20 µg de proteína microsomal em um volume total de reação de 100 µL de volume. A reação foi iniciada adicionando-se proteína microsoma. O ensaio foi interrompido e os lipídeos foram extraído com 2 mL of hexano:isopropanol (3:2) (Hara e Radin (1978) *Anal. Biochem.* 90:420-426) contendo 4 µL de triacilglicerol não marcado (trioleína, Sigma). Seguindo-se o vórtice por 10 segundos, as fases foram separadas com 1 mL de sulfato de sódio 500 mM e o vórtice foi novamente feito por 10 segundos. Após 10 minutos, a fase superior foi transferida a um outro tubo e seca com nitrogênio gasoso. O lipídeo foi ressolubilizado em um pequeno volume de hexano (aproximadamente 100 a 150 µL) e aplicado a placas de TLC

com K6 sílica, que foram desenvolvidas em 80:20:1 (v/v) hexano:diétiléter:ácido acético. Triacilglicerol foi visualizado e marcado corando-se com vapor de iodo. Após a mancha ter descorado, o triacilglicerol foi raspado, e radioactividade foi determinada por contagem de cintilação líquida.

[312] Células de levedura contendo o ORF de (ZmDGAT1-2(ASK) do alelo ASKC28IB1 DGAT1-2 expostos em Id. de Seq. nº:47) possuíam atividade de enzima DGAT 2 a 3 vezes maior que aqueles contendo o ORF (ZmDGAT 1-2(EF09B) do alelo EF09B DGAT 1-2 mostrado em Id. de Seq. nº:51. De forma mais importante, quando Phe₄₆₉ foi deletado de DGAT1-2 do alelo ASKC28IB1 (usando-se o ORF de ZmDGAT 1-2(ASK) mutante onde nt 1405-1407 (códon TTC) de Id. de Seq. nº:47 foram deletados), a atividade da enzima DGAT dentro destas células de levedura foi reduzida a um nível similar àquele observado para células de leveduras contendo o alelo EF09B DGAT 1-2. Inserindo-se um resíduo de fenilalanina entre Phe₄₆₉ e Ser₄₇₀ do DGAT 1-2 com teor normal de óleo (usando-se o ORF de ZmDGAT 1-2(EF09B) mutante com um códon TTC inserido imediatamente depois de nt 1407 de Id. de Seq. nº:51), que resulta em um ZmDGAT 1-2(EF09B) mutante com o resíduo de fenilalanina correspondendo a Phe₄₆₉ da proteína ZmDGAT 1-2(ASK), restaurou a atividade da enzima ao nível observado para células de levedura compreendendo o alelo ASKC28IB1 (isto é, ORF de ZmDGAT 1-2(ASK) de Id. de Seq. nº:47). Ver Figura 42A. A quantidade de TAG acumulada nestas células correlacionam-se muito bem com o nível de atividades de DGAT (Figura 42B). Estes resultados indicam novamente que DGAT 1-2 é o gene responsável por QTL6 e que

um resíduo de aminoácido único, Phe₄₆₉ dentro da proteína ZmDGAT 1-2(ASK) é responsável pela atividade aumentada da enzima DGAT e acúmulo de Tag na levedura.

Exemplo 13: Alelo ASKC28IB1 de DGAT1-2 está associado com o germoplasma de alto teor de óleo/alto teor de ácido oléico

[313]Conforme mostrado na Figura 33, o resíduo Phe₄₆₉ (F₄₆₉) parece estar presente em todos os DGATs tipo I de plantas e está apenas ausente a partir de certos consanguíneos de milho com conteúdos normais de óleo. Para determinar que alelo é ancestral no milho, um fragmento de DNA circundando a localização do códon para F₄₆₉ foi amplificado a partir de 50 acessos das linhas de Teosinte usando-se Id. de Seq. n^{os}: 126 e 127 como iniciadores, e os produtos de PCR resultantes foram sequenciados. Os resultados do sequenciamento mostram que todas as 50 linhas de Teosinte contêm F₄₆₉, possuindo o mesmo alelo do consanguíneo ASKC28IB1 de milho, sugerindo que o alelo ASKC28IB1 com F₄₆₉ é ancestral e que o alelo EF09B é uma mutação por deleção.

[314]O mesmo fragmento de DNA de 73 consanguíneos de milho proprietário e público com vários níveis de concentrações de óleo e ácido oléico no embrião foi amplificado e sequenciado. Os resultados mostram que o alelo ASKC28IB1 com F₄₆₉ é encontrado exclusivamente em consanguíneos de milho com alto teor de óleo e alto conteúdo de ácido oléico (Figura 43A).

[315]Como uma comparação, um fragmento de DNA da extremidade 5' do gene DGAT1-2 abrangendo a região que compreende todas as três mudanças de aminoácido descritas

mais cedo (a substituição de Val₄₅ → Gly₄₅ (também referida como V45G)); a substituição Pro₅₅ → Ser₅₅ (também referida como P55S) e a deleção do resíduo de glutamina correspondente a Gln₆₄ ou Gln₆₅ ou Gln₆₆ ou Gln₆₇ de DGAT1-do alelo EF09B (também referida como Q64 ou Q65 ou Q66 ou Q67) foi amplificado e sequenciado (usando-se Id. de Seq. n^{os}: 124 e 125). Contrariamente a F469, os alelos ASKC28IB1 para estes três aminoácidos não estão exclusivamente associados com consanguíneos de milho de alto teor de óleo e alto teor de ácido oléico. Por exemplo, Gly₄₅ (também referido como G45) encontrado em ASKC28IB1 é também encontrado em consanguíneos de milho com níveis de normal a baixo de óleo e ácido oléico, não exclusivamente no grupo ácido de alto teor de óleo e alto teor de ácido oléico (Figura 43B). Estes dados são consistentes com o mapeamento fino de QTL6 e resultados da expressão de levedura.

Exemplo 14: QTL6 (DGAT1-2) e FAD2 possuem efeitos aditivos na concentração de ácido oléico crescente

[316]O gene FAD2 de milho codifica uma desnaturase de ácido graxo delta-12 que catalisa a desnaturação de ácido oleico à forma de ácido linileico. A variação alélica no gene FAD2 é um principal contribuidor para os níveis de ácido oleico em germoplasma de milho. GR1B5 consanguíneo proprietário contém um alelo favorável para o conteúdo de ácido oléico e possui um nível de ácido oléico de cerca de 40%. Para determinar se QTL6 e o FAD2 em GR1B5 são aditivos, uma cruz foi feita entre GR1B5 e uma linha BC3S2 de QTL6 (na base de EF09B) contendo alelos homozigóticos ASKC28IB1 para o gene DGAT1-2, e sementes F2 foram subsequentemente produzidas. Os genótipos de DGAT1-2 e FAD2

foram determinados em 200 sementes F2 segregadas de uma espiga. A concentração de ácido oléico para cada semente foi também determinada. Os níveis de ácido oléico nos diferentes grupos de genótipo foram comparados. Os dados mostram que os genes QTL6 (DGAT1-2) e FAD2 possuem efeitos aditivos no aumento da concentração de ácido oléico (Figura 44). Sementes F2 contendo alelos ASKC28IB1 homozigóticos de DGAT1-2 e alelos não favoráveis homozigóticos de FAD2 possuem um nível de ácido oléico de aproximadamente 38%, enquanto que as sementes que contêm alelos favoráveis homozigóticos de FAD2 apenas possuem um conteúdo de ácido oléico de 40%. Por outro lado, os níveis de ácido oléico da semente são maiores que 50% quando alelos favoráveis homozigóticos para DGAT1-2 e FAD2 estão presentes.

[317]O efeito aditivo para aumentar a concentração de ácido oléico empilhando-se o alelo DGAT1-2(ASK) de alto teor de óleo e alto teor de ácido oléico com alelos de FAD2 favoráveis pode também ser alcançado por métodos transgênicos. Por exemplo, linhas transgênicas de milho desejáveis para a seqüência de ORF de ZmDGAT1-2(ASK) e uma seqüência inibitória que tem como alvo a expressão de FAD2 são produzidas. Qualquer seqüência inibitória que reduza ou elimine a expressão de FAD2 pode ser usada para diminuir a atividade/expressão de FAD2 de forma que a conversão de ácido oléico a ácido linoleico seja inibida, favorecendo assim o acúmulo de ácido oléico. Exemplos de seqüências de polinucleotídeo inibitórias de FAD2 e construções inibitórias incluem, mas não estão limitadas àquelas descritas na Publicação do Pedido de Patente U. S. de número 2005-0160494 e WO 2005/063988, aqui incorporados por

referência integralmente.

[318] Desta forma, as plantas transgênicas compreendendo o ORF de ZmDGAT1-2(ASK) de Id. de Seq. n°:47 e um cassete de expressão compreendendo a sequência inibitória de FAD2 exposta em Id. de Seq. n°: 133 são produzidas a fim de conferirem efeito aditivo de concentração de ácido oléico aumentada em sementes destas plantas transgênicas além daquele associado à presença do ORF de ZmDGAT1-2(ASK). Estas plantas transgênicas são obtidas empilhando-se a sequência de ORF de ZmDGAT1-2(ASK) com esta sequência inibitória de FAD2, por exemplo, por cruzamento tradicional de uma linha de planta transgênica compreendendo um cassete de expressão que compreende a sequência inibitória de FAD2 com uma linha de planta compreendendo o *locus* marcador de ZmDGAT 1-2 favorável definido por ZmDGAT1-2(ASK) de Id. de Seq. n°:47. Com este método de empilhamento, a linha que planta que porta o *locus* marcador de ZmDGAT 1-2 favorável é obtida através de métodos de cruzamento tradicionais, ou é obtida através de um método transgênico, por exemplo, através de transformação com o cassete de expressão compreendendo este *locus* marcador favorável.

[319] Alternativamente, o empilhamento é alcançado por métodos transgênicos, onde uma linha de planta é transformada com o ORF de ZmDGAT 1-2(ASK) operativamente ligado a um promotor que é funcional em uma célula de planta, e um cassete de expressão compreendendo a sequência inibitória de FAD2. O ORF de ZmDGAT 1-2(ASK) e o promotor operativamente ligado são introduzidos na planta em um cassete de expressão separado, em um mesmo vetor ou em um

vetor diferente, ou no mesmo cassete de expressão que compreende a seqüência inibidora de FAD2.

[320] Todas as publicações e pedidos de patente mencionados na especificação são indicativos do nível daqueles habilitados na técnica à qual esta invenção pertence. Todas as publicações e pedidos de patente estão aqui incorporados por referência na mesma medida como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicada para ser incorporada por referência.

[321] Embora a invenção precedente tenha sido descrita em alguns detalhes por meio de ilustração e exemplos para propósitos de clareza de compreensão, certas mudanças e modificações podem ser praticadas dentro do escopo das reivindicações em anexo.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para identificar uma primeira planta de milho ou um primeiro germoplasma de milho compreendendo em seu genoma um gene de diacylglycerol O-acyltransferase do tipo 1 (DGAT), codificando o polipeptídeo de DGAT definido na SEQ ID No: 48, e em que, o referido polipeptídeo compreende um resíduo de fenilalanina na posição de aminoácido correspondente ao resíduo 469 da SEQ ID No: 48, e ainda em que a primeira planta de milho ou o primeiro germoplasma de milho possui um fenótipo selecionado a partir do grupo consistindo de um conteúdo de óleo aumentado, um conteúdo de ácido oléico aumentado, uma relação entre ácido oléico e ácido linoléico aumentada, e quaisquer combinações destes, o referido método caracterizado pelo fato de compreender detectar na primeira planta de milho ou no primeiro germoplasma de milho pelo menos um polimorfismo dentro de um *locus* marcador que está associado ao referido fenótipo da referida primeira planta de milho ou do referido primeiro germoplasma de milho, em que o polimorfismo ocorre em, ou imediatamente seguinte, uma ou mais posições de nucleotídeos (nt) dentro do referido *locus* do marcador ou em um códon dentro do referido *locus* do marcador, em que a referida uma ou mais posições de nt ou o referido códon é selecionado do grupo consistindo em:

a) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 4 selecionada do grupo consistindo em nt 28, 204, 256, 302, 305, 341, 429, 461, e qualquer combinações dos mesmos;

b) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 6 selecionada do grupo consistindo em nt 43, 74, 208, 224, e qualquer combinações dos mesmos;

c) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 8 selecionada do grupo consistindo em nt 25, 55, 88, 100, 195, 223, 238, 242, 255, 279, 306, 307, 345, 399, e qualquer combinações dos mesmos;

d) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 10 selecionada do grupo consistindo em nt 40, 41, 88, 89, 126, 134, 146, 218, e qualquer combinações dos mesmos;

e) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 12 selecionada do grupo consistindo em nt 128, 195, 256, 257, 293, 294, 295, 296, 327 e qualquer combinações dos mesmos;

f) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 14 selecionada do grupo consistindo em nt 262 e 311, e qualquer combinações dos mesmos;

g) nt 428 da SEQ ID No: 16;

h) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 18 selecionada do grupo consistindo em nt 119, 396, 420, e qualquer combinações dos mesmos;

i) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 20 selecionada do grupo consistindo em nt 194, 258, 259, 260, 365, 366, 489, e qualquer combinações dos mesmos;

j) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 22 selecionada do grupo consistindo em nt 48, 50, 56, 60, 63, 101, 133, 166, 170, 179, 181, 206, 207, 211, 231, 237, 255, 273, 282, 294, 312, 324, 343, 345, 358, 377, 381, 385, 387, 404, e qualquer combinações dos mesmos;

k) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 24 selecionada do grupo consistindo em nt 358, 359, 371, 421, 422, 423, 425, 426, e qualquer combinações dos mesmos;

l) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 26 selecionada do grupo consistindo em nt 28, 31, 35, 43, 50,

111, 117, 143, 192, 197, 219, 266, e qualquer combinações dos mesmos;

m) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 28 selecionada do grupo consistindo em nt 41, 62, 92, 158, 182, 194, 200, 226, 229, 349, e qualquer combinações dos mesmos;

n) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 30 selecionada do grupo consistindo em nt 102, 145, 162, 165, 198, 199, 221, 247, 251, 253, 306, 331, 352, 451, 461, 464, e qualquer combinações dos mesmos;

o) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 32 selecionada do grupo consistindo em nt 61, 73, 87, 143, 199, 208, 209, 210, 211, 225, 327, 328, 335, e qualquer combinações dos mesmos;

p) pelo menos uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 51 selecionado de nt 134 e 163;

q) um códon dentro da SEQ ID No: 51 correspondente ao nt 190-192 ou nt 193-195 ou nt 196-198 ou 199-201; e

r) nt 1401 ou nt 1404 ou nt 1407 da SEQ ID No: 51, em que o referido *locus* marcador está geneticamente ligado com uma primeira região de QTL6 que é flanqueada por uma primeira sequência de borda que consiste nos nucleotídeos 1-20 de SEQ ID No:2 e uma segunda sequência de borda que consiste nos nucleotídeos 573-592 da SEQ ID No:14.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido *locus* marcador está geneticamente ligado com uma terceira região de QTL6 mapeada dentro da referida primeira região de QTL6, onde a referida terceira região de QTL6 é flanqueada por uma

primeira sequência de borda que compreende os nucleotídeos 1-20 de SEQ ID No:10 e uma segunda sequência de borda que compreende os nucleotídeos 488-507 de SEQ ID No:4.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o referido aumento no conteúdo de óleo compreende um aumento no óleo de semente, um aumento no óleo de germe ou ambos, um aumento no óleo de semente e um aumento do óleo de germe.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o referido aumento no conteúdo de ácido oléico compreende um aumento na concentração do ácido oléico da semente, um aumento na concentração de ácido oléico do germe, ou ambos, um aumento na concentração do ácido oléico da semente e concentração de ácido oléico do germe.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o referido aumento na referida relação entre ácido oléico e ácido linoleico compreende um aumento na referida relação em semente, um aumento na referida relação no referido germe, ou ambos, um aumento na referida relação em semente e em germe.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o referido primeiro germoplasma é uma linha de milho ou uma variedade de milho.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o método também compreende selecionar uma primeira planta de milho ou uma prole destes ou o primeiro germoplasma de milho ou uma prole deste.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de também compreender cruzar a primeira planta ou germoplasma de milho selecionada com uma segunda planta ou germoplasma de milho.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de o método também compreender introgridir um *lócus* QTL6 compreendendo pelo menos um dos referidos polimorfismos em uma segunda planta de milho ou um segundo germoplasma de milho para produzir uma planta de milho introgridida ou germoplasma de milho de milho introgridido.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a planta de milho introgridida ou germoplasma de milho introgridido apresentam um conteúdo de óleo aumentado, um conteúdo de ácido oléico aumentado, uma relação entre ácido oléico e ácido linoleico aumentada, e quaisquer combinações destes, quando comparados à segunda planta de milho ou segundo germoplasma de milho.

11. Polinucleotídeo isolado caracterizado pelo fato de compreender pelo menos 12 nucleotídeos consecutivos do complemento do *lócus* marcador definido na SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 ou 47 operativamente ligado um marcador detectável, onde o referido polinucleotídeo pode detectar um polimorfismo em um *lócus* marcador associado com alto conteúdo de óleo, alto conteúdo de ácido oléico ou ambos, alto conteúdo de óleo e alto conteúdo de ácido oléico.

12. Polinucleotídeo isolado, de acordo com a

reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o referido polinucleotídeo compreende pelo menos 12 nucleotídeos consecutivos de SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 ou 47.

13. Método para produzir uma planta ou parte de planta da mesma compreendendo em seu genoma um gene de diacylglycerol O-aciltransferase do tipo 1 (DGAT), codificando o polipeptídeo de DGAT definido na SEQ ID No: 48, e em que, o referido polipeptídeo compreende um resíduo de fenilalanina na posição de aminoácido correspondente ao resíduo 469 da SEQ ID No: 48, e ainda em que a planta ou parte de planta da mesma possui um fenótipo selecionado a partir do grupo consistindo de conteúdo de óleo aumentado, conteúdo de ácido oléico aumentado, relação entre ácido oléico e ácido linoleico aumentada, e qualquer combinação destes, o referido método caracterizado pelo fato de compreender introduzir na planta ou parte da planta um polinucleotídeo heterólogo compreendendo pelo menos uma sequência associada ao alto conteúdo de óleo ou pelo menos uma sequência associada ao alto conteúdo de ácido oléico operativamente ligada a um promotor ativo na planta ou parte da planta, onde a referida sequência associada ao alto conteúdo de óleo ou a referida sequência associada ao alto conteúdo de ácido oléico é derivada de uma sequência de nucleotídeo genômico geneticamente ligada a pelo menos um *locus* marcador favorável que está associado ao alto conteúdo de óleo ou ao alto conteúdo de ácido oléico, onde o marcador é selecionado a partir do grupo consistindo de SEQ ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32,

34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 e 51 com pelo menos um polimorfismo ocorrendo em, ou imediatamente seguinte, uma ou mais posições de nucleotídeos (nt) dentro do referido lócus do marcador ou em um códon dentro do referido lócus do marcador, em que a referido uma ou mais posições de nt ou o referido códon é selecionado do grupo consistindo em:

a) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 4 selecionada do grupo consistindo em nt 28, 204, 256, 302, 305, 341, 429, 461, e qualquer combinações dos mesmos;

b) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 6 selecionada do grupo consistindo em nt 43, 74, 208, 224, e qualquer combinações dos mesmos;

c) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 8 selecionada do grupo consistindo em nt 25, 55, 88, 100, 195, 223, 238, 242, 255, 279, 306, 307, 345, 399, e qualquer combinações dos mesmos;

d) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 10 selecionada do grupo consistindo em nt 40, 41, 88, 89, 126, 134, 146, 218, e qualquer combinações dos mesmos;

e) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 12 selecionada do grupo consistindo em nt 128, 195, 256, 257, 293, 294, 295, 296, 327, e qualquer combinações dos mesmos;

f) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 14 selecionada do grupo consistindo em nt 262 e 311, e qualquer combinações dos mesmos;

g) nt 428 da SEQ ID No: 16;

h) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 18 selecionada do grupo consistindo em nt 119, 396, 420, e qualquer combinações dos mesmos;

i) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 20

selecionada do grupo consistindo em nt 194, 258, 259, 260, 365, 366, 489, e qualquer combinações dos mesmos;

j) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 22 selecionada do grupo consistindo em nt 48, 50, 56, 60, 63, 101, 133, 166, 170, 179, 181, 206, 207, 211, 231, 237, 255, 273, 282, 294, 312, 324, 343, 345, 358, 377, 381, 385, 387, 404, e qualquer combinações dos mesmos;

k) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 24 selecionada do grupo consistindo em nt 358, 359, 371, 421, 422, 423, 425, 426, e qualquer combinações dos mesmos;

l) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 26 selecionada do grupo consistindo em nt 28, 31, 35, 43, 50, 111, 117, 143, 192, 197, 219, 266, e qualquer combinações dos mesmos;

m) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 28 selecionada do grupo consistindo em nt 41, 62, 92, 158, 182, 194, 200, 226, 229, 349, e qualquer combinações dos mesmos;

n) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 30 selecionada do grupo consistindo em nt 102, 145, 162, 165, 198, 199, 221, 247, 251, 253, 306, 331, 352, 451, 461, 464, e qualquer combinações dos mesmos;

o) uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 32 selecionada do grupo consistindo em nt 61, 73, 87, 143, 199, 208, 209, 210, 211, 225, 327, 328, 335, e qualquer combinações dos mesmos;

p) pelo menos uma posição de nt dentro da SEQ ID No: 51 selecionado de nt 134 e 163;

q) um códon dentro da SEQ ID No: 51 correspondente ao nt 190-192 ou nt 193-195 ou nt 196-198 ou 199-201; e

r) nt 1401 ou nt 1404 ou nt 1407 da SEQ ID No: 51, através do qual a expressão do polinucleotídeo compreendendo a sequência associada ao alto conteúdo de óleo ou a sequência associada ao alto conteúdo de ácido oléico aumenta o conteúdo de óleo da planta ou parte da planta, aumenta o conteúdo de ácido oléico da planta ou parte da planta, aumenta a relação entre o ácido oléico e o ácido linoleico da planta ou parte da planta, ou qualquer combinação destes.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a sequência associada ao alto conteúdo de óleo aumenta o conteúdo de óleo de germe da planta, o conteúdo de óleo de semente da planta, ou ambos, o conteúdo de óleo de germe e o conteúdo de óleo de semente da planta.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que a sequência associada ao alto conteúdo de ácido oléico aumenta o conteúdo de ácido oléico de germe da planta, o conteúdo de ácido oléico de semente da planta, ou ambos, o conteúdo de ácido oléico de germe e o conteúdo de ácido oléico de semente da planta.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a sequência associada ao alto conteúdo de ácido oléico aumenta a relação entre ácido oléico e ácido linoleico no germe da planta, na semente da planta ou em ambos, no germe e na semente da planta.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 16, caracterizado pelo fato de que o referido polinucleotídeo compreendendo a sequência

associada ao alto conteúdo de óleo ou a sequência associada ao alto conteúdo de ácido oléico compreende um quadro de leitura aberto, um sRNA ou um miRNA.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 17, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo compreendendo a sequência associada ao alto conteúdo de óleo ou a sequência associada ao alto conteúdo de ácido oléico é isolado pela clonagem posicional e é identificado pela ligação a pelo menos um *locus* marcador favorável.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 18, caracterizado pelo fato de que a referida planta ou parte de planta possui estavelmente incorporado em seu genoma um polinucleotídeo heterólogo codificando o polipeptídeo possuindo um domínio LEC1-tipo B consistindo na sequência de aminoácido definida na SEQ ID No:65 operativamente ligada a um promotor ativo na planta ou parte da planta.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o referido polinucleotídeo heterólogo codificando o domínio LEC1-tipo B compreende a sequência de polinucleotídeo definida na SEQ ID No:66.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 20, caracterizado pelo fato de que a referida planta ou parte de planta também compreende um polinucleotídeo heterólogo compreendendo uma sequência inibidora de FAD2 que é capaz de inibir a expressão ou função de FAD2 possuindo uma sequência de aminoácido definida na SEQ ID No:132.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21,

caracterizado pelo fato de que a referida sequência inibidora de FAD2 consiste na sequência definida na SEQ ID No:133.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 22, caracterizado pelo fato de que a planta ou parte de planta compreende o alelo favorável para FAD2 da SEQ ID No:131, onde o referido alelo favorável está associado com um fenótipo de alto conteúdo de ácido oléico na referida planta ou parte de planta.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 23, caracterizado pelo fato de que a referida planta é uma monocotiledônea.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida monocotiledônea é milho, trigo, arroz, cevada, sorgo ou centeio.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 23, caracterizado pelo fato de que a referida planta é uma dicotiledônea.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a dicotiledônea é soja, Brassica, girassol, algodão ou alfafa.

28. Método para identificar a presença de um *locus* marcador que está associado com um conteúdo de óleo aumentado, um conteúdo de ácido oléico aumentado, e/ou uma relação entre ácido oléico e ácido linoleico aumentada em uma planta de milho ou germoplasma de milho, onde o referido *locus* marcador está geneticamente ligado com uma primeira região de QTL6 que é flanqueada por uma primeira sequência de borda que compreende os nucleotídeos 1-20 da SEQ ID No:6 e uma segunda sequência de borda que compreende

os nucleotídeos 573-592 da SEQ ID No:14, o referido método caracterizado pelo fato de que compreende determinar a concentração de ácido oléico na semente da referida planta de milho ou germoplasma de milho, onde uma concentração (mol/mol) de ácido oléico de pelo menos 35% é preditiva da presença do referido *lócus* marcador dentro da referida planta de milho ou germoplasma de milho.

29. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o referido *lócus* marcador está geneticamente ligado com uma segunda região de QTL6 mapeada dentro da referida primeira região de QTL6, onde a referida segunda região de QTL6 é flanqueada por uma primeira sequência de borda que compreende os nucleotídeos 1-20 da SEQ ID No:10 e a segunda sequência de borda que compreende os nucleotídeos 488-507 da SEQ ID No:4.

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o referido *lócus* marcador consiste na sequência de polinucleotídeo definida na SEQ ID No:51 codificando DGAT 1-2 com pelo menos um polimorfismo neste selecionado de:

a) pelo menos uma posição de nt dentro SEQ ID No:51 selecionado de nt 134 e 163;

b) um códon dentro da SEQ ID No:51 correspondente ao nt 190-192 ou nt 193-195 ou nt 196-198 ou 199-201; e

c) nt 1401 ou nt 1404 ou nt 1407 da SEQ ID No: 51.

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o referido *lócus* marcador compreende a sequência definida na SEQ ID No: 47.

32. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 31, caracterizado pelo fato de que uma

concentração de ácido oléico de menos de cerca de 35% é preditiva de que a referida planta de milho ou germoplasma de milho não compreende o referido *lócus* marcador dentro de seu genoma.

33. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 32, caracterizado pelo fato de também compreender detectar a presença de um polimorfismo em um *lócus* marcador consistindo no polinucleotídeo definido na SEQ ID No: 51, onde o referido polimorfismo resulta em uma mudança polimórfica selecionada a partir do grupo consistindo de:

- a) uma substituição de T → G em nt 134 da SEQ ID No: 51;
- b) uma substituição de C → T na posição 163 da SEQ ID No: 51;
- c) uma exclusão do códon CAG nas posições nt 190-192, 193-195, 196-198 ou 199-201 da SEQ ID No: 51; e
- d) uma inserção de códon TTC imediatamente depois de nt 1401, 1404 ou 1407.

Mapeamento de QTL6 em uma População de BC2

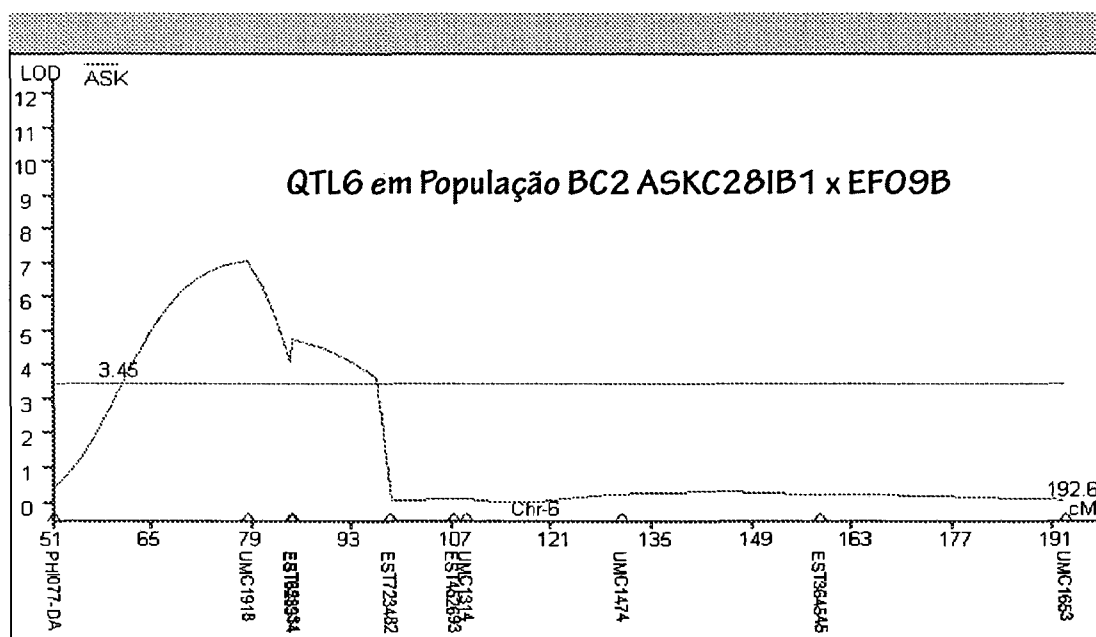


FIGURA 1

Mapeamento Fino de QTL6

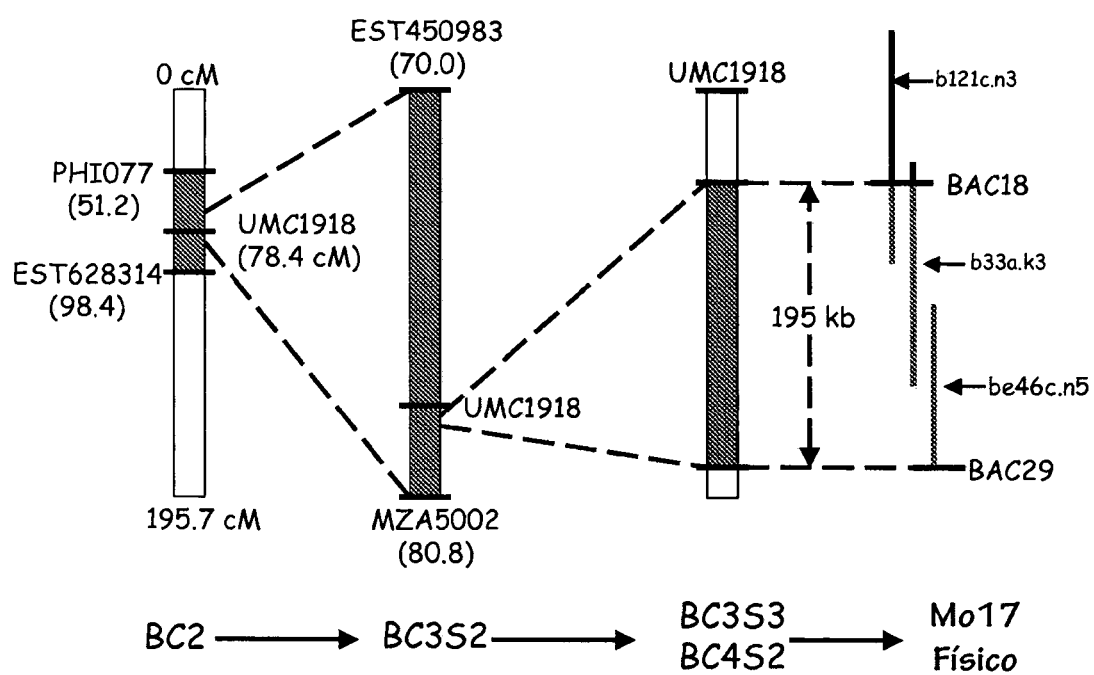


FIGURA 2

NILs de BC3S2

	% Óleo Emb	% Óleo Sem
QTL6+/+	35.8	5.1
QTL6 -/-	31.6	4.4
Mudança	4.1	0.8
% Mudança	13.1	17.4
Valor P	1.9E-07	1.3E-04

NILs de BC4S2

	% Óleo Emb	% Óleo Sem
QTL6+/+	33.3	4.4
QTL6-/-	28.7	3.7
Mudança	4.7	0.7
% Mudança	16.2	19.2
Valor P	9.7E-18	2.1E-11

FIGURA 3

NILs de BC3S2

	R18:1(%)	R18:2(%)
QTL6+/+	36.2	46.4
QTL6-/-	24.6	58.5
Mudança	11.6	-12.1
% Mudança	47.0	-20.6
Valor P	4.0E-11	9.0E-11

NILs de BC4S2

	R18:1(%)	R18:2(%)
QTL6+/+	37.9	45.4
QTL6-/-	23.6	59.8
Mudança	14.4	-14.4
% Mudança	61.0	-24.1
Valor P	1.4E-07	3.0E-07

FIGURA 4

	% Óleo Emb	% Óleo Cerne
QTL6		
-/-	30.1	3.9
+/+	35.1	4.9
LEC1		
-/-	26.8	3.7
+/+	35.1	4.6
QTL6/LEC1		
+/-, +/-	39.7	6.1

FIGURA 5

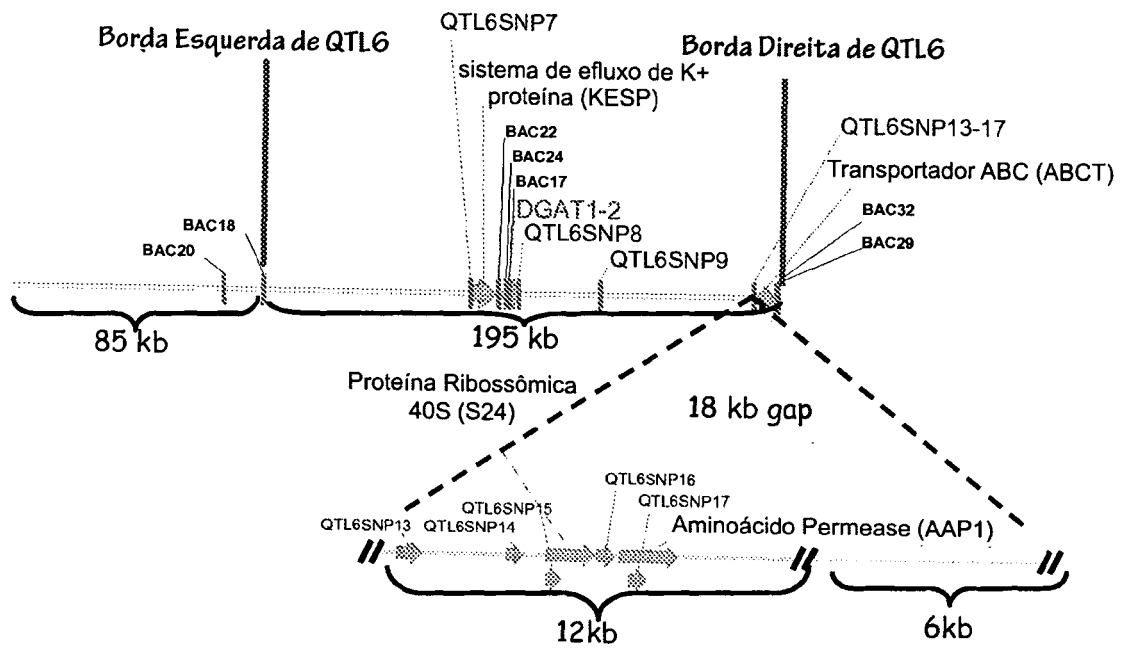


FIGURA 6

OTL6 BAC05

Iniciador de avance (86488): 5'-CGAGAAAAGCCTATTGACTTGAGAA

Iniciador reverso (86489): 5'-TTGCATAGCCATTCTTACGTAGTT

Sequências de Marcador e alinhamento:

BAC05-ASK	(1)	GGGAGACCTAATGTTTGAACACAGACATCTTGGAGACAA
BAC05-EF09B	(1)	GGGAGAGTATGACATGAGAGAGGAGCGATCTGGAGACAA
BAC05-ASK	(51)	GTCTGGAGCTTTCCAACTGTGGCAAGTAAACCTTGGACAA
BAC05-EF09B	(51)	TCTTAGGGTTCTTCACACCAAGAACTAGTCAAAGGTTTGGAGGA
BAC05-ASK	(101)	GTGACCTCGAGGCGAATCTTGGCTTGTGTTGTTACCTATTC
BAC05-EF09B	(101)	GTGACCTCAGGTAACCATATCTGTCTCTGTCTCTTACTTCTC
BAC05-ASK	(149)	AGATTACTTGTTCATTAAGATCTTCAAGGTTTGGCTTCACTATAT
BAC05-EF09B	(151)	AGCTTTACTGTTTATATAAATTCTTCAAGTTTCATCTTGAATGATAT
BAC05-ASK	(199)	ATGTGATATATGAGAGCTTTCCTCTGCGCATATAGCTTACTCTATC
BAC05-EF09B	(201)	ATGTCTAATATAACACTTCTGTTTTCATAGCTTACTCTATC
BAC05-ASK	(249)	CTACTGCAATAGAAATTATGCAATCATTAAGATTAAATAGCTC
BAC05-EF09B	(251)	CTAGAATATAGAAATTACTTCAATAGTTAAGTTGATTAAGCTC
BAC05-ASK	(299)	GGCAAGTTTCGATCTCAAATCTCCGTCACACCTCGAAGCTCTAGC
BAC05-EF09B	(301)	GGCAAGTTTGGAGCTCAAGAGCCGTCACATCTCGAAGCTCTAGC
BAC05-ASK	(349)	CCGACCTACTGAGGCAATAGCAATACCTCCATTTGTATCTC
BAC05-EF09B	(351)	CCGACCTGACTAGGCAATAGCAATACCTCCATTTGTATCTC
BAC05-ASK	(399)	AGTAATAGGTCTATTTACGCAATACCTCTCTCTCTCTCTCTCT
BAC05-EF09B	(400)	AGTTCTAAGGTCTATTTACGCAATACCTCTCTCTCTCTCTCTCT
BAC05-ASK	(449)	TAGCAATTTTAGAGTGGATCAAGCAAGTTCTCTCTCTCTCTCT
BAC05-EF09B	(450)	TAGCAATTTTAGAGTGGATCAAGCAAGTTCTCTCTCTCTCTCT
BAC05-ASK	(499)	CACTAGTAAGGATGGTATCCA
BAC05-EF09B	(500)	CACTAGTAAGGATGGTATCCA

FIGURA 7

QTL6 BAC17

Iniciador de avanço(86512): 5'-CAGATTAACATGTCAATGCATTACC

Iniciador reverso (86513): 5'-GCTTGTAACCCCTTTCCTAACATG

Seqüências de Marcador e alinhamento:

BAC17-ASK	(1)	CAGATTAACATGTCAATGCATTACCCTTCAGTACTTTGGACAAACCC
BAC17-EF09B	(1)	CAGATTAACATGTCAATGCATTAGCTTCAGTACTTTGGACAAACCC
BAC17-ASK	(51)	TATATCATATTTGTAATGTCATAAGACAAAGCTTCATCCACATGATG
BAC17-EF09B	(51)	TATATCATATTTGTAATGTCATAAGACAAAGCTTCATCCACATGATG
BAC17-ASK	(101)	TGGCAAGTAACATTAGGCACAAATTCAGATAGTACTGCTGAGTCAACCT
BAC17-EF09B	(101)	TGGCAAGTAACATTAGGCACAAATTCAGATAGTACTGCTGAGTCAACCT
BAC17-ASK	(151)	CAGATTTTCCGGATATGACTGAACGATATTCATATTCATGCTGCTGG
BAC17-EF09B	(151)	CAGATTTTCCGGATATGACTGAACGATATTCATATTCATGCTGCTGG
BAC17-ASK	(201)	ATCATCTTTCAAGTAACAATTCCTTGGCAATATACAAACTTAACCT
BAC17-EF09B	(201)	ATCATCTTTCAAGTAACAATTCCTTGGCAATATACAAACTTAACCT
BAC17-ASK	(251)	TAACAGATTAAGGCATCAACCATAACACATTTCTTAACCTTGCAGTCTCA
BAC17-EF09B	(251)	TAACAGATTAAGGCATCAACCATAACACATTTCTTAACCTTGCAGTCTCA
BAC17-ASK	(301)	CTACATAAATCAATCAAAAGTAACCTGCTCTTAATGCTCTTTTG
BAC17-EF09B	(301)	CAATAATATATCAATCAAAAGGTAACTTCTCTTAATGCTCTTTTG
BAC17-ASK	(351)	AGAGATACCAATTGAGCTCAACCAAGTCTACTACTTGCACATTAACSTCA
BAC17-EF09B	(351)	AGAGATAACCAATTGAGCTCAACCAAGTCTACTACTTGCACATTAACSTCA
BAC17-ASK	(401)	CAATACTACAGTTTGTATTCAATTTGCAACCATCTGAACCAATATA
BAC17-EF09B	(401)	CAATACTACAGTTTGTATTCAATTTGCAACCATCTGAACCAATATA
BAC17-ASK	(451)	CAATTTTGTTGCAAAATGGAACATCAGTTTCTGTAGGAAATGCT
BAC17-EF09B	(451)	CAATTTTCTTGCAAAATGGAACATCAGTTTCTGTAGGAAATGCT
BAC17-ASK	(501)	TACAGG
BAC17-EF09B	(501)	TACAGG

FIGURA 8

QTL6 BAC18

Iniciador de avanço(86514): 5'- GCACTTGTTTGCAACAACACTACTATTGT

Iniciador reverso (86515): 5'- GGATCAACTTTTGAACGTGGTGCT

Seqüências de Marcador e alinhamento:

BAC18-ASK	(1)	GCACCTTGTTTGCAACAACACTACTATTGTGCTTGCCTGCACAAATACAA
BAC18-EF09B	(1)	GCACCTTGTTTGCAACAACACTACTATTGTGCTTGCCTGCACAAATACAA
BAC18-ASK	(51)	CTTACCTCTCAATATAGTATAACTCTCTCGAATTTTCTAGCTACAGCT
BAC18-EF09B	(51)	CTTACCTCTCAATATAGTATAACCGCTCTCAATTTTCTAGCTACAGCT
BAC18-ASK	(101)	GCAATTCATAATTTCTTAGTTTAGACAAATATGAACAAACGGAGGTAG
BAC18-EF09B	(101)	GCAATTCATAATTTCTTAGTTTAGACAAATATGAACAAACGGAGGTAG
BAC18-ASK	(151)	ACTATTTACTGACCAACAACTGCTTATGCTCTAAATATCTCCAGCCAA
BAC18-EF09B	(151)	ACTATTTACTGACCAACAACTGCTTATGCTCTAAATATCTCCAGCCAA
BAC18-ASK	(201)	ACATATCTTTTGTCTGACCTCTGCTTTTCCAAATGACGACGTTCAAAAG
BAC18-EF09B	(201)	ACATATCTTTTGTCTGACCTCTGCTTTTCCAAATGACGACGTTCAAAAG
BAC18-ASK	(251)	GGATC
BAC18-EF09B	(251)	TTGATCC

FIGURA 9

QTL6 BAC20

Iniciador de avanço(86518): 5'- TGTATGTGCTTGCGCGTTACG

Iniciador reverso (86519): 5'- CACCCTAGGCAGGAGATGGAGT

Seqüências de Marcador e alinhamento:

BAC20-ASK	(1)	GTATGTGCTTGCGCGTTACGAGTAAAAAAAGTATGAAACATAA
BAC20-EF09B	(1)	GTATGTGCTTGCGCGTTACGAGTAAAAAAAGTATGAAACATAA
BAC20-ASK	(51)	ATACCAATATACAAATTAACCTACACATGCCAAATTTTGTGGCAAAACA
BAC20-EF09B	(51)	ATACCGAACACAAACATAACCTACACATGCCAAATTTTGTGGCAAAACG
BAC20-ASK	(101)	TACCAATATACAAATTAATTTATTTATTACCGGAGCATCCCTCCAG
BAC20-EF09B	(101)	TACCAATATACCAATTAATTTATTTATTACCGGAGCATCCCTCCAG
BAC20-ASK	(151)	ATGCTCTCGGGGAGTGGAAATACATGCTTGTGTGGGGTTATCTCGA
BAC20-EF09B	(151)	ATGCTCTCGGGGAGTGGAAATACATGCTTGTGTGGGGTTATCTCGA
BAC20-ASK	(201)	CCGAGTTGTGACCGTGTCTCTGCCCCGGGTTGCTCCGTGTACCCGT
BAC20-EF09B	(201)	CCGAGTTGTGACCGTGTCTCTCACTCGGGGTTGCTCTGTCCGAGCTGT
BAC20-ASK	(251)	ATACCTCTCCGGGACGAGGTGGCTTGGTGGAGTTTACTGTCTGTG
BAC20-EF09B	(251)	ATACCTCTCTCCGGGACGAGGTGGCTTGGCTTGGGAGTTTACTGTCTGTG
BAC20-ASK	(301)	ACATCTCAGGATGGCCTCGGGCGTGTCTGTGACTGTGTCTCCCGCCGGGAG
BAC20-EF09B	(301)	ACATCTCAGGATGGCCTCGGGCGTGTCTGTGACTGTGTCTCCCGCCGGGAG
BAC20-ASK	(351)	TTGGCCTCGAACGAGTCGTGACTGTCTGCCCCCAAGGATGCGCTGGG
BAC20-EF09B	(308)	TTGGCCTCGAACGAGTCGTGACTGTCTGCCCCCAAGGATGCGCTGGG
BAC20-ASK	(401)	GGGCTGTGACTGTCTCTCTCTCTGGGGTTGGCTTAAACGACTGTGGA
BAC20-EF09B	(322)	GGGCTGTGACTGTCTCTCTCTCTGGGGTTGGCTTAAACGACTGTGGA
BAC20-ASK	(451)	CTGGATGTCCGGGCGAGGATGGCTTAAAGGCTGTCTGACTGTGATCTCC
BAC20-EF09B	(372)	CTGGATGTCCGGGCGAGGATGGCTTAAAGGCTGTCTGACTGTGATCTCC
BAC20-ASK	(501)	ATCTTAGGGTG
BAC20-EF09B	(422)	ATCTTAGGGTG

FIGURA 10

QTL6 BAC22

Iniciador de avanço (86522): 5' - AACTAGGCATACGGATTTAAAATTTCC

Iniciador reverso (86523): 5' - CATGTCCAAGTTCGTGTGGTATTTTTC

Seqüências de Marcador e alinhamento:

BAC22-ASK	(1)	AACTAGGCATACGGATTTAAAATTTCC--CTCCATCC
BAC22-EF09B	(1)	AACTAGGCATACGGATTTAAAATTTCTATACATACACACCTCAATCC
BAC22-ASK	(49)	CTAGAACCCATCCACTCCAGCTGCTAATTCACCATACGCAAGCCGACCA
BAC22-EF09B	(51)	CTAGAACCCATCCACTCCAGCTGCTAATTCACCATACCAAGCCGACCA
BAC22-ASK	(99)	GCACATGCTATAATCTAAGTGAATTAATTCATGAACTCACCACCTA
BAC22-EF09B	(101)	GCACATGCTATAATCTAAGTGAATTAATTCATGAACTCACCACCTA
BAC22-ASK	(149)	TTACATTCCTGCTCCATCCATCCACAAAGTGATATCTGACCAAGCTTAC
BAC22-EF09B	(151)	TTACATTCCTGCTCCATCCATCCACAAAGTGATATCTGACCAAGCTTAC
BAC22-ASK	(199)	TTAAGCTTCTCTGGA--TAAATATACACGAATCTGGACCTC
BAC22-EF09B	(201)	TTAAGCTTCTCTGGA--TAAATATACACGAATCTGGACCTC

FIGURA 11

QTL6 BAC24

Iniciador de avanço(86526): 5' - ATCTTAGGACTGGTGGGAATGCCAAA

Iniciador reverso (86527): 5' - GGCTGACAAAAAATAGACTAATTGTCAG

Seqüências de Marcador e alinhamento:

BAC24-ASK	(1)	ATCTTAGGACTGGTGGGAATGCCAAA
BAC24-EF09B	(1)	ATCTTAGGACTGGTGGGAATGCCAAA
BAC24-ASK	(51)	TTAAATTCAGTTTCCTTTTGGAGTGAAGCTTAAATAGGACTGACA
BAC24-EF09B	(51)	TTAAATTCAGTTTCCTTTTGGAGTGAAGCTTAAATAGGACTGACA
BAC24-ASK	(101)	CAATTATACTCTCATGTACTTAAATGCGATGGTATTTGGGGCITTACG
BAC24-EF09B	(101)	CAATTATACTCTCATGTACTTAAATGCGATGGTATTTGGGGCITTACG
BAC24-ASK	(151)	CACTACTGCAATATCTGGAAATAGCTAACTTTTGTACTTTCATAT
BAC24-EF09B	(151)	CACTACTGCAATATCTGGAAATAGCTAACTTTTGTACTTTCATAT
BAC24-ASK	(201)	CAGATCTAATACCTTTTATTTAGTGGAGCTTGTACTTAACAAAGCA
BAC24-EF09B	(201)	CAGATCTAATACCTTTTATTTAGTGGAGCTTGTACTTAACAAAGCA
BAC24-ASK	(251)	CAGTAAATGGGAGTGGTACTCTTCTATTTAGTTAAGACTT-----CACT
BAC24-EF09B	(251)	CAGTGTATGGGAGTGGTACTCTTCTATTTAGTTAAGACTTCCCTTACT
BAC24-ASK	(297)	CTCTCACTGAGCTTGAGATAATTGATATTAATATCTTCAAAATACCTG
BAC24-EF09B	(301)	CTCTCACTGAGCTTGAGATAATTGCTAATAAATCTTTCAAAATACCTG
BAC24-ASK	(347)	ACAAATAGTCTATTTTGTGAGCC
BAC24-EF09B	(351)	ACAAATAGTCTATTTTGTGAGCC

FIGURA 12

QTL6 BAC29

Iniciador de avanço (86536): 5' - TAACAGTGGGACGGCAAAGAACTAG

Iniciador reverso (86537): 5' - TGAGCTTTCCTTGACCATAACAAGG

Seqüências de Marcador e alinhamento:

BAC29-ASK	(1)	TAACAGTGGGACGGCAAAGAACTAG
BAC29-EF09B	(1)	TAACAGTGGGACGGCAAAGAACTAG
BAC29-ASK	(51)	GAATATAAAGGCAAGAGACAGCAATGAACCTTAAAGGAGGACAAAG
BAC29-EF09B	(51)	GAATATAAAGGCAAGAGACAGCAATGAACCTTAAAGGAGGACAAAG
BAC29-ASK	(101)	TCCATGAACAAAGAGATAGCAAGAAATAGTCTTACCACTTTGAGCA
BAC29-EF09B	(101)	TCCATGAACAAAGAGATAGCAAGAAATAGTCTTACCACTTTGAGCA
BAC29-ASK	(151)	ATGATCATGCACTTCCAAAGTCCAGCTCTTCTCTGAAATCCGACCTG
BAC29-EF09B	(151)	ATGATCATGCACTTCCAAAGTCCAGCTCTTCTCTGAAATCCGACCTG
BAC29-ASK	(201)	CATTGCTGGATCAAGACACAGCAGCAAGTCTTGAAGAACCTGCTCA
BAC29-EF09B	(201)	CATTGCTGGATCAAGACACAGCAGCAAGTCTTGAAGAACCTGCTCA
BAC29-ASK	(251)	ATACATAATATTAATTAGCCATTACAGAAATCTGATTCAGAAATGTT
BAC29-EF09B	(251)	ATACATAATATTAATTAGCCATTACAGAAATCTGATTCAGAAATGTT
BAC29-ASK	(301)	ATATAAAGCAATACCTTTTATTACCTGTCAGCAATCTGCAAGCAAG
BAC29-EF09B	(301)	ATATAAAGCAATACCTTTTATTACCTGTCAGCAATCTGCAAGCAAG
BAC29-ASK	(351)	TATGCTGTATTAATGTCACAGAAAGCCATACTATAGATTCAATTAATGAG
BAC29-EF09B	(351)	TATGCTGTATTAATGTCACAGAAAGCCATACTATAGATTCAATTAATGAG
BAC29-ASK	(401)	ATCCCATTCAGCAATCAGCTTCGCTACTCTGCAAGCAATAGGACAGGATAG
BAC29-EF09B	(401)	ATCCCATTCAGCAATCAGCTTCGCTACTCTGCAAGCAATAGGACAGGATAG
BAC29-ASK	(451)	AATAGCAGCTTCGGTGCTTTCGAAATCCGCAAGCTTGTATGCTGCAAG
BAC29-EF09B	(451)	AATAGCAGCTTCGGTGCTTTCGAAATCCGCAAGCTTGTATGCTGCAAG
BAC29-ASK	(501)	GAAGCTC
BAC29-EF09B	(501)	GAAGCTC

FIGURA 13

QTL6 BAC32

Iniciador de avanço (86542): 5'- TGAAGATGTACACAAATGAATTGCG

Iniciador reverso (86543): 5'- GTCAAATGTCTCCAGCAGATTGTG

Sequências de Marcador e alinhamento:

BAC32-ASK	(1)	TTGAAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-EF09B	(1)	TTGAAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-ASK	(51)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-EF09B	(51)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-ASK	(101)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-EF09B	(101)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-ASK	(151)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-EF09B	(151)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-ASK	(201)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-EF09B	(201)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-ASK	(251)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-EF09B	(251)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-ASK	(301)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-EF09B	(301)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-ASK	(351)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-EF09B	(351)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-ASK	(401)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-EF09B	(401)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-ASK	(451)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-EF09B	(451)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-ASK	(501)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-EF09B	(501)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-ASK	(551)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG
BAC32-EF09B	(551)	TGAGATGTACACAAATGAATTGCG

FIGURA 14

QTL6SNP7

Iniciador de avanço(96066): 5' - TGACACGTCGCCGTAGCAACCA

Iniciador reverso (96067): 5' - TTGAAGCTGCCAGGGTCGGTCT

Seqüências de Marcador e alinhamento:

QTL6SNP7-ASK	(1)	TCACATTTTGGCTAGCAACAACTTGGGCTTCTCTTCCTCTCCGCTTC
QTL6SNP7-EF09B	(1)	TCACATTTTGGGCTTAGCAACAACTTGGGCTTCTCTTCCTCTCCGCTTC
QTL6SNP7-ASK	(51)	CTGGTTTGGCGTTTGGCTCTTCTCTGGCGTCTGGTCCGATTCTCCCTAGCTGC
QTL6SNP7-EF09B	(51)	CTGGTTTGGCGTTTGGCTCTTCTCTGGCGTCTGGTCCGATTCTCCCTAGCTGC
QTL6SNP7-ASK	(101)	GGTCCGCGATGACAGCTCTACGCGGTTCTGGGCGAGAGCGGCTGGCGGGG
QTL6SNP7-EF09B	(101)	GGTCCGCGCGATGACAGCTCTACGCGGTTCTGGGCGAGAGCGGCTGGCGGGG
QTL6SNP7-ASK	(151)	TACCGGATCTTAGAGCTTAGAGCGGAGAGGCTGGGGGATCTTCTTGGCTGTC
QTL6SNP7-EF09B	(151)	TACCGGATCTTAGAGCTTAGAGCGGAGAGGCTGGGGGATCTTCTTGGCTGTC
QTL6SNP7-ASK	(201)	GGCGATGCGCGGCTGACAGCTGCTGGCTCACTCCGATGCTACCGGCTGCTCA
QTL6SNP7-EF09B	(201)	GGCGATGCGCGGCTGACAGCTGCTGGCTCACTCCGATGCTACCGGCTGCTCA
QTL6SNP7-ASK	(251)	CGAGGCGAGCTTTCGCGCATGATGCGAGCGGCTTCCAGAGAGTTC
QTL6SNP7-EF09B	(251)	CGAGGCGAGCTTTCGCGCATGATGCGAGCGGCTTCCAGAGAGTTC
QTL6SNP7-ASK	(301)	CTGAGTCTGAGGGCGAGCAGGGCGCTGGAGGTGCTGCTGATCTTGGCCAAC
QTL6SNP7-EF09B	(301)	CTGAGTCTGAGGGCGAGCAGGGCGCTGGAGGTGCTGCTGATCTTGGCCAAC
QTL6SNP7-ASK	(351)	CGAGGCTTGCATGCTTCCGTTCTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
QTL6SNP7-EF09B	(351)	CGAGGCTTGCATGCTTCCGTTCTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
QTL6SNP7-ASK	(401)	GGGTTGTTGGCTTGGCTTATTTGTTAGATCTGGCTTCTGGTTGTTGGAG
QTL6SNP7-EF09B	(401)	GGGTTGTTGGCTTGGCTTATTTGTTAGATCTGGCTTCTGGTTGTTGGAG
QTL6SNP7-ASK	(451)	CTGTGGGCGCTTGCAGATGAGGCTCTATGCTTGAAGTTTGGTTGCT
QTL6SNP7-EF09B	(451)	CTGTGGGCGCTTGCAGATGAGGCTCTATGCTTGAAGTTTGGTTGCT
QTL6SNP7-ASK	(501)	TGCTGCTTCTGCTGCTTGGCTTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
QTL6SNP7-EF09B	(501)	TGCTGCTTCTGCTGCTTGGCTTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT

FIGURA 15

QTL6SNP8

Iniciador de avanço(96068): 5' - GGCTTTGGGGGTGCGATACTT

Iniciador reverso (96069): 5' - CGGTTCACTCTCGCTCATGTAAGT

Seqüências de Marcador e alinhamento:

QTL6SNP8-ASK	(1)	GGCTTTGGGGGTGCGATACTTGGGGGACCGGTCGGGCTGGGAGCTTGG
QTL6SNP8-EF09B	(1)	GGCTTTGGGGGTGCGATACTTGGGGGACCGGTCGGGCTGGGAGCTTGG
QTL6SNP8-ASK	(51)	TGCTTGGTGGGAGAGGAGAGAGCGAGCTCGGTGTTTGGTGGAGTGT
QTL6SNP8-EF09B	(51)	TGCTTGGTGGGAGAGGAGAGAGCGAGCTCGGTGTTTGGTGGAGTGT
QTL6SNP8-ASK	(101)	GTGGGGGTGGGGCTGGGGGACAGAGAGCGGAGTGGGGAGTGGGGGCT
QTL6SNP8-EF09B	(101)	GTGGGGGTGGGGCTGGGGGACAGAGAGCGGAGTGGGGAGTGGGGGCT
QTL6SNP8-ASK	(151)	TGAGAGGGGACAGCGGAGCGGCTGAGCTTGGGAGGGGTCTCTCGCTCA
QTL6SNP8-EF09B	(151)	TGAGAGGGGACAGCGGAGCGGCTGAGCTTGGGAGGGGTCTCTCGCTCA
QTL6SNP8-ASK	(201)	CGGCTTGGTGGGAGGGGTGGGGTGGGGTGGGCTGGGAGTGGGAGGAGTC
QTL6SNP8-EF09B	(201)	CGGCTTGGTGGGAGGGGTGGGGTGGGGTGGGCTGGGAGTGGGAGGAGTC
QTL6SNP8-ASK	(251)	GGGAGG---AGGCTGCTGGTGGGCTGGGAGTGGGAGTGGGAGGAGTC
QTL6SNP8-EF09B	(251)	GGGAGG---AGGCTGCTGGTGGGCTGGGAGTGGGAGTGGGAGGAGTC
QTL6SNP8-ASK	(298)	TGGGCTGAGGATGGGAGGCTGGGCTGGGAGTGGGAGTGGGAGGAGTC
QTL6SNP8-EF09B	(301)	TGGGCTGAGGATGGGAGGCTGGGCTGGGAGTGGGAGTGGGAGGAGTC
QTL6SNP8-ASK	(348)	AAATCAAACTTGGGATGGGAGTGGGCTGGGAGTGGGAGTGGGAGGAGTC
QTL6SNP8-EF09B	(351)	AAATCAAACTTGGGATGGGAGTGGGCTGGGAGTGGGAGTGGGAGGAGTC
QTL6SNP8-ASK	(398)	GAAGTACCACTTGAATCATTAAGTAAATTTGGCTTTTACAAATTTAAAC
QTL6SNP8-EF09B	(401)	GAAGTACCACTTGAATCATTAAGTAAATTTGGCTTTTACAAATTTAAAC
QTL6SNP8-ASK	(448)	TATTTTAAATTCAGGATTCCTACAAACATTCAGGAGGAGTGGTCTTAAAT
QTL6SNP8-EF09B	(451)	TATTTTAAATTCAGGATTCCTACAAACATTCAGGAGGAGTGGTCTTAAAT
QTL6SNP8-ASK	(498)	CTTACATGAGGAGAGTGAAGCT
QTL6SNP8-EF09B	(501)	CTTACATGAGGAGAGTGAAGCT

FIGURA 16

OTL6SNP9

Iniciador de avanço(96070): 5'- CCACCACACATAACTAGACTCGTCTG

Iniciador reverso (96071): 5' - ACACCTCTGTTTGAGGTCTGAGGAAA

Sequências de Marcador e alinhamento:

QTL6SNP9-ASK (1) CACCACTACATACCTGACTCTCTGCTTCAGATACCATATCATATCA
QTL6SNP9-EF09B (1) CCACTACCACTACATACCTGACTCTCTGCTTCAGATACCATATCATATCA

QTL6SNP9-ASK (51) TTTTCTTAGTCTCTCTAAACAAATATATGTCCTTCTCTACTCTAG
QTL6SNP9-EF09B (51) TTTTCTTAGTCTCTCTAAACAAATATATGTCCTTCTCTACTCTAG

QTL6SNP9-ASK	(100)	CAGTGGGCTTAAAGCGTTGATAGAGGATGAGTCTGGTGGGCGTCCGCGT
QTL6SNP9-EF09B	(101)	TATGGGCGTAAAGCGTTGATAGAGGATGAGTCTGGTGGGCGTCCGCGT

QTL6SNP9-ASK (150) T T T A A G G C G A C T A C A G A T A T G A A C A G C T A T A C A G G C T A A
QTL6SNP9-EF09B (151) T T T A A G G C G A C C A C G A T A T A A T T T C T A T A C A G G C T A A

QTL6SNP9-ASK (199) TTTAAATTTT--TTTCACATCAGCTTGACTTACGATTCGGTATACATATTT
QTL6SNP9-EF09B (199) TTTTATTTGATTTTACATGAGCTTGACTTACGATTCGATATACATATTT

QTL6SNP9-ASK (247) AATGCA TCTGACCTTACGGCATC GGCCTC AATGCTCTGGAGCTC
QTL6SNP9-EF09B (249) AATGCA TCTGACCTTACGGCATC GGCCTC AATGCTCTGGAGCTC

QTL6SNP9-ASK (297) ACCCTAATGAGAGAGATCCTGAGCCACATGTTCTGTGTCTACCCCTACACACCGCCG
QTL6SNP9-EF09B (298) ACCCTAATGAGAGAGATCCTGAGCCACATGTTCTGTGTCTACCCCTACACACTCTCTC

QTL6SNP9-ASK (347) C T A T G C T C G C T T A C C C T C G T T G G G A C C T C A A C T A C C T T C C C T C T G C
QTL6SNP9-EF09B (348) C T A T G C T C G C C A A C C T C G T T G G G A C C A C G G T T G A T T C C C T C T G C

QTL6SNP9-ASK (397) C C A C C T T G T A G A G C C T C A G A C C C A G C C A G A G A G G T A A T T T T T C C T C
QTL6SNP9-EF09B (398) C C C C C W T A G A C C C T C A G A C C C A G C C A G A G A G G T A A T T T T T C C T C

QTL6SNP9-ASK	(447)	ATGCGCTGACACAGAGCTGT
OTL6SNP9-EF09B	(448)	CGAGCTGACACAGAGCTGT

FIGURA 17

QTL6SNP13

Iniciador de avanço (96080): 5'- CTCGCGTTAACCACGCAACACAAAAG

Iniciador reverso (96081): 5'- GGCGTGGCCGATTTCGATTCT

Sequências de Marcador e alinhamento:

[illegible]

FIGURA 18

OTL6SNP14

Iniciador de avanço(96082): 5'- CTGTCATGGACTAGGTAACCAACTCG

Iniciador reverso (96083): 5' - GCAGCAGATGTCGTCCTGACAG

Sequências de Marcador e alinhamento:

QTL6SNP14-ASK	(1)	CGTCATGCACIAGCGTAACCAACACGGTACCTATATATAATCTCTCC-
QTL6SNP14-EF09B	(1)	CGTCATGCACIAGCGTAACCAACACGGTACCTATATATAATCTCTCC
QTL6SNP14-ASK	(50)	TTTIAAGACTATATAAATGAGCGAGCGGAGGCGCCTTGGACAMATCACA
QTL6SNP14-EF09B	(51)	TTTIAAGACTATATAAATGAGCGAGCGGAGGCGCCTTGGACAMATCACA
QTL6SNP14-ASK	(100)	CTCACATATCAATTTCCATGCGCGCGCATGAGCCCGAGTCCCG
QTL6SNP14-EF09B	(101)	CTCACATATGACATGTCCATGCGCGCGCATGAGCCCGAGTCCCG
QTL6SNP14-ASK	(150)	CGCGTGGAGGATAATAGGCGCATACAGGCTTGCGATCTCATGCACTCGG
QTL6SNP14-EF09B	(151)	CGCGTGGAGGATAATAGGCGCATACAGGCTTGCGATCTCATGCACTCGG
QTL6SNP14-ASK	(200)	CACCTCAACTTGGTGTAAATTTTTCACATCGACATATATAGCCTATAG
QTL6SNP14-EF09B	(201)	CACCTCAACTTGGTGTAAATTTTTCACATCGACATATATAGCCTATAG
QTL6SNP14-ASK	(250)	TGGAAGACAAACATTTATTTCATTAAGAAATCTTACCATGCAATC
QTL6SNP14-EF09B	(251)	TGGAAGACAAACAAATTTTCATTAAGAAATCTTACCATGCAATC
QTL6SNP14-ASK	(300)	TAAGCTTAAATTCATTTCGAGAGCGCTCTACGGCAAAATTATCCTTTTAA
QTL6SNP14-EF09B	(301)	TAAGCTTAAATTCATTTCGAGAGCGCTCTACGGCAAAATTATCCTTTTAA
QTL6SNP14-ASK	(350)	CTTACAGTACCTCAGACCATCTGCATATGATCCTAATATCATCATTCGAA
QTL6SNP14-EF09B	(351)	CTTACAGTACCTCAGACCATCTGCATATGATCCTAATATCATCATTCGAA
QTL6SNP14-ASK	(400)	TTTACATTTTAGGGGAAATTAAGAAATTAACAAATTTTCAATTTACCTTT
QTL6SNP14-EF09B	(401)	TTTACATTTTAGGGGAAATTAAGAAATTAACAAATTTTCAATTTACCTTT
QTL6SNP14-ASK	(450)	GGCATGAAATTTGGATGGATGGTGGCTGTACTGTGCAATGACCAACATC
QTL6SNP14-EF09B	(451)	GGCATGAAATTTGGATGGATGGTGGCTGTACTGTGCAATGACCAACATC
QTL6SNP14-ASK	(500)	GGTTC
QTL6SNP14-EF09B	(501)	GGTTC

FIGURA 19

QTL6SNP15

Iniciador de avanço (96084): 5'- CCGCAACAGCTAGTCAGCAGA

Iniciador reverso (96085): 5'- TGAGGCGGTACTTGGGCTCG

Seqüências de Marcador e alinhamento:

QTL6SNP15-ASK	(1)	CCCAACAGCTAGTCAGCAGTTCAGCAATGGCTCACTCGAAGCTGGC
QTL6SNP15-EF09B	(1)	CCCAACAGCTAGTCAGCAGTTCAGCAATGGCTCACTCGAAGCTGGC
QTL6SNP15-ASK	(51)	CTCTGGTGAAGTCGGTACGGCGCAATTCATGATTAACCTTTTCTCT
QTL6SNP15-EF09B	(51)	CTCTGGTGAAGTCGGTACGGCGCAATTCATGATTAACCTTTTCTCT
QTL6SNP15-ASK	(101)	CCCAACAGCTAGTTCAGTTCAGGCTCATCCACTCGGGCTTCAGCACTG
QTL6SNP15-EF09B	(101)	CCCAACAGCTAGTTCAGTTCAGGCTCATCCACTCGGGCTTCAGCACTG
QTL6SNP15-ASK	(151)	CCCAACCTTCAGCTTCGGTTCCTTAGTTCCTCGCTTCCTCGCTTCCT
QTL6SNP15-EF09B	(151)	CCCAACCTTCAGCTTCGGTTCCTTAGTTCCTCGCTTCCTCGCTTCCT
QTL6SNP15-ASK	(201)	CCCAACGGCGCTTCGGCTTCAGGCTATTTCAATGCTTCGGCTTCGGCT
QTL6SNP15-EF09B	(201)	CCCAACGGCGCTTCGGCTTCAGGCTATTTCAATGCTTCGGCTTCGGCT
QTL6SNP15-ASK	(251)	CCCAACGGCGCTTCGGCTTCAGGCTATTTCAATGCTTCGGCTTCGGCT
QTL6SNP15-EF09B	(251)	CCCAACGGCGCTTCGGCTTCAGGCTATTTCAATGCTTCGGCTTCGGCT
QTL6SNP15-ASK	(301)	CCCAACCTTCAGCTTCGGTTCCTTAGTTCCTCGCTTCCTCGCTTCCT
QTL6SNP15-EF09B	(301)	CCCAACCTTCAGCTTCGGTTCCTTAGTTCCTCGCTTCCTCGCTTCCT
QTL6SNP15-ASK	(351)	CCCAACCTTCAGCTTCGGTTCCTTAGTTCCTCGCTTCCTCGCTTCCT
QTL6SNP15-EF09B	(351)	CCCAACCTTCAGCTTCGGTTCCTTAGTTCCTCGCTTCCTCGCTTCCT
QTL6SNP15-ASK	(401)	CCCAACCTTCAGCTTCGGTTCCTTAGTTCCTCGCTTCCTCGCTTCCT
QTL6SNP15-EF09B	(401)	CCCAACCTTCAGCTTCGGTTCCTTAGTTCCTCGCTTCCTCGCTTCCT

FIGURA 20

QTL6SNP16

Iniciador de avanço (96086): 5'- TTTTGTGCACTCGGTACACTGAAG

Iniciador reverso (96087): 5' - CAGGACGTGTGTACGTACTCCGAT

Seqüências de Marcador e alinhamento:

QTL6SNP16-ASK	(1)	TTGTGCACTCCGTACACTCGAATTCGATGCAAGCTTGGATTGAA
QTL6SNP16-EF09B	(1)	TTTCTGCACTCTGCTACACTCGAAGTGGATGCAAGCTTCTGATTGAA
QTL6SNP16-ASK	(51)	AGCTTTATAATATAAGATTCTTGTTAATTAGATTCTGTTTATGTTAATTAC
QTL6SNP16-EF09B	(51)	AGCTTTATAATATAAGATTCTTGTTAATTAGATTCTGTTTATGTTAATTAC
QTL6SNP16-ASK	(101)	CATTATATAATTAAAGCTTTATACATAAACCCTCCTTAATGCGAATCTA
QTL6SNP16-EF09B	(101)	TATTTATATATTAAAGCTTTATACATAAACCCTCCTTAATGCGCCTGTA
QTL6SNP16-ASK	(151)	TAAAGAGTTTCTTAAGTAAGACATAGAAATTCGGTACACTCTAATGG
QTL6SNP16-EF09B	(151)	TAAAGAGTTTCTTAAGTAAGACATAGAAATTCGGTACACTCTAATARM
QTL6SNP16-ASK	(201)	ATGATATATATATTTAGTTTCTTTATATTTACAAAGCAACTCTAAGCT
QTL6SNP16-EF09B	(201)	ATGATATATATATTTAGTTTCTTTATATTTAGAAAGCAAGACTCTTGCGT
QTL6SNP16-ASK	(251)	TTTACACCCGACAAACATTTCTGCACTAGTGCATTCCTGTTGACGCG
QTL6SNP16-EF09B	(251)	CTGGACACCGGACCAATGATTCTGCTCACTAGTGCATTCGCTTACACG
QTL6SNP16-ASK	(301)	ACGTTTATTTTACTTCCCGATGCTTGGCCACTGGCCAGGTGCCACCTTAC
QTL6SNP16-EF09B	(301)	ACGTTTATTTTACTTCCCGATGCTTGGCCAMTGGCCAGGTGCCACCTTAC
QTL6SNP16-ASK	(351)	CTTTGCGCGCGCTTCACTGCTTCATTTCCTTCGATCTTACCGCGCTTCC
QTL6SNP16-EF09B	(351)	CTTTGCGCGCGCTTCACTGCTTCATTTCCTTCGATCTTACCGCGCTTCC
QTL6SNP16-ASK	(401)	CTTTGCGCGCTTCTTCCCTTCTCGGACGCTTGGCGCTCCGGGCTTAC
QTL6SNP16-EF09B	(401)	CTTTGCGCGCTTCTTCCCTTCTCGGACGCTTGGCGCTCCGGGCTTAC
QTL6SNP16-ASK	(451)	CTGGCGCTTATTTCCCTTCTCGGACGCTTGGCGCTCCGGGCTTAC
QTL6SNP16-EF09B	(451)	CTGGCGCTTATTTCCCTTCTCGGACGCTTGGCGCTCCGGGCTTAC
QTL6SNP16-ASK	(501)	CTGGCTACCTACATACGCTGCT
QTL6SNP16-EF09B	(501)	CTGGCTACCTACATACGCTGCT

FIGURA 21

QTL6SNP17

Iniciador de avanço(96088): 5'- CGGGCCTGTGATCCTGCTGCTCTT

Iniciador reverso (96089): 5'- CACGCCGAAGCCGACGATGT

Seqüências de Marcador e alinhamento:

QTL6SNP17-ASK	(1)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-EF09B	(1)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-ASK	(51)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-EF09B	(51)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-ASK	(101)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-EF09B	(101)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-ASK	(151)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-EF09B	(146)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-ASK	(201)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-EF09B	(196)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-ASK	(247)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-EF09B	(246)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-ASK	(297)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-EF09B	(296)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-ASK	(345)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-EF09B	(345)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-ASK	(395)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-EF09B	(395)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-ASK	(445)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-EF09B	(445)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-ASK	(495)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT
QTL6SNP17-EF09B	(495)	CGGGCTGTGATCCTGCTGCTGCTCTT

FIGURA 22

MZA5002

Iniciador de avanço (82263): 5'- AAGTCGCGCGAGTTCATGGT

Iniciador reverso (82264): 5'- TTATTCCTGCATCATCATCCAC

Sequências de Marcador e alinhamento:

MZA5002-ASK	(1)	AAGTCGTCGGAATTCATGGTCCAGCTTCTCTCCCGACGGCTCGTCG
MZA5002-EF09B	(1)	AAGTCGTCGGAATTCATGGTCCAGCTTCTCTCCCGACGGCTCGTCG
MZA5002-ASK	(51)	CTGCCAACCGGACCAATATATTAACCGGTGACCGGCTTCGTGT
MZA5002-EF09B	(51)	CTGCCAAGGCAGATCAAGGTGGGCTTACACCGGACGGGTCGTGT
MZA5002-ASK	(101)	CGTTCGTCAGATCCCTATCTGACCCATACCTTACGCTTATATGCCAAG
MZA5002-EF09B	(101)	GGCTGTGGCAGGCGCGCGGCGCGACCTACACCTTCGGTCCGATGGCGAAG
MZA5002-ASK	(151)	CATATGTTGATACGACAGGAGGTAACGGATTCGTCGCGGTCGGGCGAT
MZA5002-EF09B	(151)	AAGGTGTGCTATGACAGGAGGTGAGCGCGCTTGTGGAGCGCGGCGGAT
MZA5002-ASK	(201)	CGATGGCTTGGTGGGATAGGAGTGGAGGCTCTCATCTGGGTACCA
MZA5002-EF09B	(201)	CGACGGCTCTCGCGCGCTTAAACAGCAAGCGGCTCTCATCTCGATCACAA
MZA5002-ASK	(251)	CTCCGAGATCGTCTCTCGTCCCTCCGGACCAATATGTGTTCGCGACCG
MZA5002-EF09B	(251)	TCTCCGAGATCTCTCTCAACCGCGTCCGCGACAGATCGTGTTCGCGACCG
MZA5002-ASK	(301)	CGGTCCGGGATCGGAGCGCTATCTGTACCGATTCGAGCTCGAGCC
MZA5002-EF09B	(301)	CGGTCCGGGATCGGAGCGCTATCTGTATACCGGCTTCGAGCTCGAGCC
MZA5002-ASK	(351)	CG-----CGCGGACACAAAGCCGCGAAGCCCTCGCGCGCGCG
MZA5002-EF09B	(351)	CGCGGCGGCCGAGCGGACACAAAGAGGCGCGAGCAAGCCGCGCG
MZA5002-ASK	(392)	CTGCGGCAATGATCTGCTACCTAGTTTCTGCGCGCGCGCGCG
MZA5002-EF09B	(401)	CGGCGCGCAATGATCTGCTAGCTCTCGGCGCGCGCGCGCGCG
MZA5002-ASK	(440)	CGTGGCGTCTCGATCGATAGTGGCGCGCTTCTGCTACAGTTCAG
MZA5002-EF09B	(451)	CGTGGCGTCTCTATCCGATAGTGGCGCGCTTCTGCTACAGTTCAG
MZA5002-ASK	(490)	CGATTCTGCTTCCCTTCCCTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
MZA5002-EF09B	(501)	CGATTCTGCTTCCCTTCTCTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
MZA5002-ASK	(540)	GGTGAAGCAATTA
MZA5002-EF09B	(551)	GGTGAAGCAATTA

FIGURA 23

MZA13321

Iniciador de avanço (82328): 5'-CAGCAAGGAGCTGAGACAAAT

Iniciador reverso (82329): 5'-AGCAAACAAGTTTTTGGTGGC

Sequências de Marcador e alinhamento:

MZA13321-ASK	(1)	CAGCAAGGAGCTGAGACAAATTTTCGATTCCTTATCATGTCAGAC
MZA13321-EF09B (Parcial)	(1)	CAGCAAGGAGCTGAGACAAATTTTCGATTCCTTATCATGTCAGAC
MZA13321-ASK	(51)	CATCAGCATCTAAGTTTCATCAATCATGCAATATGATTTTCAGTCC
MZA13321-EF09B (Parcial)	(51)	CATCAGCATCTAAGTTTCATCAATCATGCAATATGATTTTCAGTCC
MZA13321-ASK	(101)	TTCTGGTAACTATCTTTTCTATTTGATTGAGCTGAGTATCTGAAAGCT
MZA13321-EF09B (Parcial)	(101)	TTCTGGTAACTATCTTTTCTATTTGATTGAGCTGAGTATCTGAAAGCT
MZA13321-ASK	(151)	TTTCTAGTTGATGACATGGAGGAMATTCTTATATATCTCTCTGCT
MZA13321-EF09B (Parcial)	(151)	TTTCTAGTTGATGACATGGAGGAMATTCTTATATATCTCTCTGCT
MZA13321-ASK	(201)	AAATACAGGACATAGTTTCAAGAGAAACATGTTTTGACAACTGG
MZA13321-EF09B (Parcial)	(201)	AAATACAGGACATAGTTTCAAGAGAAACATGTTTTGACAACTGG
MZA13321-ASK	(251)	ACAGCAATTGCAAAATTTTACGCAAGGCTGATTTTCTTTTAA
MZA13321-EF09B (Parcial)	(251)	ACAGCAATTGCAAAATTTTACGCAAGGCTGATTTTCTTTTAA
MZA13321-ASK	(301)	CATAAGCAACATTCAGAAAGTGTACCTGCAATTTTAAACTTTACT
MZA13321-EF09B (Parcial)	(301)	CATAAGCAACATTCAGAAAGTGTACCTGCAATTTTAAACTTTACT
MZA13321-ASK	(351)	CAGATGAGCTCTCTGCCCAATTTTGTTCTTTTTCATCTTAACTCTAGAC
MZA13321-EF09B (Parcial)	(351)	CAGATGAGCTCTCTGCCCAATTTTGTTCTTTTTCATCTTAACTCTAGAC
MZA13321-ASK	(401)	AACATAAGAGTTCTGCGCTTCAATTCCTTTTCATGTTTTCTATCT
MZA13321-EF09B (Parcial)	(401)	AACATAAGAGTTCTGCGCTTCAATTCCTTTTCATGTTTTCTATCT
MZA13321-ASK	(451)	GTTATCTGTATGCAGCTTCAATTTGTTTGCTGAATTTACTTTTCAATTT

FIGURA 24A

```

MZA13321-EF09B(Parcial) (451) -----
      MZA13321-ASK (501) AACAAATATATTTGTCCTGTTTCGTGTTTCTTAATTCAGAAAAGAGGAATGC
MZA13321-EF09B(Parcial) (475) -----
      MZA13321-ASK (551) CATTCATTTTTGTTCGATGCATTGCTTCCATGTTCCGTTTTTAATATGTT
MZA13321-EF09B(Parcial) (475) -----
      MZA13321-ASK (601) ATGTTGGCATCTGATTTTATCCGGTCATCTCATTGGTGTGTTTTGCTTTAC
MZA13321-EF09B(Parcial) (475) -----
      MZA13321-ASK (651) CTGATACATTGAGCAGGAGTCCTTCGATGCATCAAACCGGTAACATCTG
MZA13321-EF09B(Parcial) (475) -----
      MZA13321-ASK (701) ATGATATACATTTCATTCTTCGAGAATCTTGCTAAGAAGAAGAAACAGAGG
MZA13321-EF09B(Parcial) (475) -----
      MZA13321-ASK (751) TTATCTTAGCTTTTGTGACCGCATCGGACCCACCTGAGGCAATCGTTCT
MZA13321-EF09B(Parcial) (475) -----
      MZA13321-ASK (801) GCTGGACAGAGGTCCTAGTTTGTTGGGCTAGTAAATGTAATGTTATCTTA
MZA13321-EF09B(Parcial) (475) -----
      MZA13321-ASK (851) GGTGGTACTTACTAATCGGGCCAATAATGTTGAATTCTAGCTGGAACGCG
MZA13321-EF09B(Parcial) (475) -----
      MZA13321-ASK (901) GTAATGTAATGATGCACCGAAGTCGCTTGCAAGTAGGTTCCCGATGCCCCA
MZA13321-EF09B(Parcial) (475) -----
      MZA13321-ASK (951) AGCCACCAAAAACCTTGTTTGCT
MZA13321-EF09B(Parcial) (475) -----

```

FIGURA 24B

MZA15785

Iniciador de avanço(82326): 5'-CCCAGCTCAACAAGGACG

Iniciador reverso (82327): 5'-CTGTATCTGCAAAACGAGAAG

Sequências de Marcador e alinhamento:

MZA15785-ASK	(1)	CTTACCTTACCAAGGACCAAGCTAAGCAATGCTCAAGCTCAAGCTTTTG
MZA15785-EF09B	(1)	CCCAATCAACCAAGGACCAAGCTAAGCAATGCTCAAGCTCAAGCTTTTG
MZA15785-ASK	(51)	CTTGAGGTCCTGAGAGACTTCAAGGTTTGTGCCCCATCACTTCGAGCACTCC
MZA15785-EF09B	(51)	CTTGAGGCTCTGAGAGACTTCAAGGTTTGTGCCCCATCACTTCGAGCACTCC
MZA15785-ASK	(101)	CTAGCAACAGCTCCAGTACACTTTCAGTTCTAETCCGAGCAGGGAGG
MZA15785-EF09B	(101)	CTAGCAACAGCTCCAGTACACTTTCAGTTCTAETCCGAGCAGGGAGG
MZA15785-ASK	(151)	AGTTGGGTCGGCTGCTTCATCCAGCTGGCTGGTACCGTACTGACGAA
MZA15785-EF09B	(151)	AGTTGGGTCGGCTGCTTCATCCAGCTGGCTGGTACCGTACTGACGAA
MZA15785-ASK	(201)	GAAGTCAGCACTCTTTTCCCTCAGAGGAGGAGGCTTCACTTCGCGA
MZA15785-EF09B	(201)	GAAGTCAGCACTCTTTTCCCTCAGAGGAGGAGGCTTCACTTCGCGA
MZA15785-ASK	(251)	TTTCTAGCAATCTTCACTTCCTTCACTTATCTCACTTCTCACTTCTCA
MZA15785-EF09B	(251)	TTTCTAGCAATCTTCACTTCCTTCACTTATCTCACTTCTCACTTCTCA
MZA15785-ASK	(301)	TCGCGCTTCTTCTCACTTCTCACTTCTCACTTCTCACTTCTCACTTCTCA
MZA15785-EF09B	(301)	TCGCGCTTCTTCTCACTTCTCACTTCTCACTTCTCACTTCTCACTTCTCA
MZA15785-ASK	(351)	CTAGTCAGCACTCTTTTCCCTCAGAGGAGGAGGCTTCACTTCGCGA
MZA15785-EF09B	(351)	CTAGTCAGCACTCTTTTCCCTCAGAGGAGGAGGCTTCACTTCGCGA
MZA15785-ASK	(401)	CTAGTCAGCACTCTTTTCCCTCAGAGGAGGAGGCTTCACTTCGCGA
MZA15785-EF09B	(401)	CTAGTCAGCACTCTTTTCCCTCAGAGGAGGAGGCTTCACTTCGCGA
MZA15785-ASK	(451)	CTAGTCAGCACTCTTTTCCCTCAGAGGAGGAGGCTTCACTTCGCGA
MZA15785-EF09B	(451)	CTAGTCAGCACTCTTTTCCCTCAGAGGAGGAGGCTTCACTTCGCGA

FIGURA 25

MZA13118

Iniciador de avanço(82324): 5'-GGCGATGCAGAAGGTCGG

Iniciador reverso (82325): 5'-TAAGCTCATGGATACACCGG

MZA13118-ASK	(1)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-EF09B	(1)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-ASK	(51)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-EF09B	(51)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-ASK	(101)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-EF09B	(101)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-ASK	(151)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-EF09B	(151)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-ASK	(201)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-EF09B	(201)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-ASK	(251)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-EF09B	(251)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-ASK	(301)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-EF09B	(301)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-ASK	(351)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-EF09B	(351)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-ASK	(401)	GGCGATGCAGAAGGTCGG
MZA13118-EF09B	(401)	GGCGATGCAGAAGGTCGG

FIGURA 26

MZA11771

Iniciador de avanço(82314): 5'-AGGTCAC TGAACCAAATCAG

Iniciador reverso (82315): 5'-GGATATAGACTGAAAGGGAA

MZA11771-ASK	(1)	GGT TACTGATCCATCTGAGGATGATATAGCTTAGGATGGGAGG
MZA11771-EF09B	(1)	GGTTCAC TGAACCAAATGAGGGAAGATGAGAASTTAGGAATGAGGAGG
MZA11771-ASK	(51)	GAGTGGGCTTCAGTTCATAGCATCAGTGGTTCATTCATAGGAGAA
MZA11771-EF09B	(51)	GAGTGGGATCATCATGCAAAAGCATCTCTCTTCTATCTCATTAAGAGAA
MZA11771-ASK	(101)	ATGAAATGTCACATATAAGAGAGATTTTCACAAGTAAATTGCCAGCTAACT
MZA11771-EF09B	(101)	ATGAATCTCTCACATATAAGAGATTTTCACAAGCTAAATGCCAGCTAACT
MZA11771-ASK	(151)	AAATATATGATCACTGGACCAACACAAAGATGTAAAGTCCAGTTTACA
MZA11771-EF09B	(151)	AAATATATGATCACTGGACCAACACAAAGATGTAAAGTCCAGTTTACA
MZA11771-ASK	(201)	AATTCATCGCAATCGTGCATCATCAAAATTTTAAACAGTTGAGAGATGCC
MZA11771-EF09B	(201)	AATTCATCGCAATCGTGCATCATCAAAATTTTAAACAGTTGAGATGLAA
MZA11771-ASK	(251)	AGGATCAATAGCAATCAAAATGCTCTCTTAAACAGCTGCTTTAGG
MZA11771-EF09B	(251)	AGGATCAATAGCAATGCAAAATGCTCTCTTAAACAGCTGCTTTAGG
MZA11771-ASK	(301)	TAACTCAATTCATCTCTCAAAATTTTAAACAGCTGCTTTAGG
MZA11771-EF09B	(301)	TAACTCAATTCATCTCTCAAAATTTTAAACAGCTGCTTTAGG
MZA11771-ASK	(351)	TACACGATCTTACATGCTCAAAATTTTAAACAGCTGCTTTAGG
MZA11771-EF09B	(351)	TACACGATCTTACATGCTCAAAATTTTAAACAGCTGCTTTAGG
MZA11771-ASK	(401)	ATGCAATAGCAATGCAAAATGCTCTCTTAAACAGCTGCTTTAGG
MZA11771-EF09B	(401)	ATGCAATAGCAATGCAAAATGCTCTCTTAAACAGCTGCTTTAGG
MZA11771-ASK	(451)	TATATCC
MZA11771-EF09B	(451)	TATATCC

FIGURA 27

MZA9351

Iniciador de avance(82334): 5'-ATGACCTTGACTCTCCCAAG

Iniciador reverso (82335): 5'-AGATGCATACATACTACATCTG

MZA9351-ASK	(1)	ATGACCTTGACTCTCCCAAGGTTTGTTCTTAGAATATTGTCTTTATGGTAG
MZA9351-EF09B (Partial)	(1)	-----
MZA9351-ASK	(51)	GCTAATATTATGCAATCCGCTTCAGTTGGAAAAGTTGATGAATTTATTATA
MZA9351-EF09B (Partial)	(1)	-----
MZA9351-ASK	(101)	TTGGGTGCTGCGTTGTTCTTAAAAATTTCAACCCAAACACAAAGTATGTT
MZA9351-EF09B (Partial)	(1)	-----
MZA9351-ASK	(151)	ATAAGGAATCCTGCCCCCGCCCTCTAATTTAACTTAATTTTTTCTTA
MZA9351-EF09B (Partial)	(1)	-----
MZA9351-ASK	(201)	CTTATAAAGTAGACTGCATATGAACATACTGGTAAATAAATGTAGATTAA
MZA9351-EF09B (Partial)	(1)	-----
MZA9351-ASK	(251)	TTGAGGAAAAAATAATGGTCAGTAGGTCCCCCAAC
MZA9351-EF09B (Partial)	(1)	-----
MZA9351-ASK	(301)	ATCATACTGCTTACAGATCTAATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-EF09B (Partial)	(16)	CTAGGAGGATACAGATCTAATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-ASK	(351)	TTTGTACCTAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-EF09B (Partial)	(66)	CTTGTACCTAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-ASK	(401)	TTTGTACCTAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-EF09B (Partial)	(116)	CTTGTACCTAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-ASK	(451)	TTTGTACCTAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-EF09B (Partial)	(166)	CTTGTACCTAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-ASK	(501)	TTTGTACCTAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-EF09B (Partial)	(216)	CTTGTACCTAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-ASK	(551)	GATGGATAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-EF09B (Partial)	(266)	GATGGATAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-ASK	(601)	GATGGATAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-EF09B (Partial)	(316)	GATGGATAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-ASK	(651)	GATGGATAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-EF09B (Partial)	(366)	GATGGATAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-ASK	(701)	GATGGATAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-EF09B (Partial)	(416)	GATGGATAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-ASK	(751)	GATGGATAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT
MZA9351-EF09B (Partial)	(466)	GATGGATAGGATCTCTATCTTATCTCTGTAATT

FIGURA 28

MZA8135

Iniciador de avanço(82336): 5'-CTGCGCATGTTGTATTCTCAT

Iniciador reverso (82337): 5'-TCAACAAACAGATGGCTGTGG

MZA8135-ASK	(1)	TCGCGATATGTTATCTGATTTATAGAGGTATATACCTAAATTAG
MZA8135-EF09B	(1)	TCGCGATGTTTATTTTCATATCTGATAGATATACAAATAATATP
MZA8135-ASK	(51)	TAAATAAAATTCATGTCCTTAATGTCCTTTGGTACATCCCTG
MZA8135-EF09B	(51)	TATCAAAATTCGAGAGTGTATATGTGTCTCTCTCGGATTACGGT
MZA8135-ASK	(101)	GCGCCCTTCTATGTCGATGTTTGTTTGATTAATGCTACATACAG
MZA8135-EF09B	(100)	GGCCCTTCTATGTCGATGTTTGTCTTGGTTAATCTGCTACATACAG
MZA8135-ASK	(151)	ATTACATAGCACTTCTCATTTTCTGTGACATGGGPTCTCACTGG
MZA8135-EF09B	(150)	ATTACATAGCGCTTCCATTTTCTGTGACATGGGPTCTCTACCTGG
MZA8135-ASK	(201)	AGCTCGCTGTGTGCGGTGTGTGTCATGAATCAGGGTGGCTTGGCAATCTAT
MZA8135-EF09B	(200)	AGCTCGCTGTGTGCGGTGTGTGTCATGAATCAGGGTGGCTTGGCAATCTAT
MZA8135-ASK	(251)	GCTTACGCTGTGGAACCTGGAAATCTCCCTGTGCTCTTACTCTAGGA
MZA8135-EF09B	(250)	GCTTACGCTGTGGAACCTGGAAATCTCCCTGTGCTCTTACTCTAGGA
MZA8135-ASK	(301)	AGCAGCTCTCATCTTTTAACTCTCTCTCGGCTCTCTCTCTATTGG
MZA8135-EF09B	(300)	AGCAGCTCTCATCTTTTAACTCTCTCTCGGCTCTCTCTCTATTGG
MZA8135-ASK	(349)	ATACAGCATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
MZA8135-EF09B	(350)	ATACAGCATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
MZA8135-ASK	(399)	TATTACTTACAGTTGCTAGCGAGAGCAACACATCTTCTCAGCTTCA
MZA8135-EF09B	(398)	TATTACTTACAGTTGCTAGCGAGAGCAACACATCTTCTCAGCTTCA
MZA8135-ASK	(449)	CGTGGAGTGTGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
MZA8135-EF09B	(448)	CGTGGAGTGTGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
MZA8135-ASK	(499)	
MZA8135-EF09B	(496)	

FIGURA 29

Alinhamentos de Aminoácidos ZmDGAT1-2

	1	50
ZmDGAT1-2 (ASK)	(1)	MAPPPSMPAASDRAGPGRDAGDSSSLRLRRAPSADAGDLAGDSSVGLREN
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(1)	MAPPPSMPAASDRAGPGRDAGDSSSLRLRRAPSADAGDLAGDSSVGLREN
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(1)	MAPPPSMPAASDRAGPGRDAGDSSSLRLRRAPSADAGDLAGDSSVGLREN
ZmDGAT1-2 (B73)	(1)	MAPPPSMPAASDRAGPGRDAGDSSSLRLRRAPSADAGDLAGDSSVGLREN
Consenso	(1)	MAPPPSMPAASDRAGPGRDAGDSSSLRLRRAPSADAGDLAGDSSVGLREN
	51	100
ZmDGAT1-2 (ASK)	(51)	GEPQSPNTNPPPPQEQQQ-HEMLYYRASAPAHRRVKESPLSSDAIFRQSHAG
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(51)	GEPQSPNTNPPPPQEQQQHEMLYYRASAPAHRRVKESPLSSDAIFRQSHAG
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(51)	GEPQSPNTNPPPPQEQQQHEMLYYRASAPAHRRVKESPLSSDAIFRQSHAG
ZmDGAT1-2 (B73)	(51)	GEPQSPNTNPPPPQEQQQHEMLYYRASAPAHRRVKESPLSSDAIFRQSHAG
Consenso	(51)	GEPQSPNTNPPPPQEQQQHEMLYYRASAPAHRRVKESPLSSDAIFRQSHAG
	101	150
ZmDGAT1-2 (ASK)	(100)	LLNLCIVVLIIVNSRLIIENLMKYGLLIRAGFWFSARSLGDWFLLMCCLT
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(101)	LLNLCIVVLIIVNSRLIIENLMKYGLLIRAGFWFSARSLGDWFLLMCCLT
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(101)	LLNLCIVVLIIVNSRLIIENLMKYGLLIRAGFWFSARSLGDWFLLMCCLT
ZmDGAT1-2 (B73)	(101)	LLNLCIVVLIIVNSRLIIENLMKYGLLIRAGFWFSARSLGDWFLLMCCLT
Consenso	(101)	LLNLCIVVLIIVNSRLIIENLMKYGLLIRAGFWFSARSLGDWFLLMCCLT
	151	200
ZmDGAT1-2 (ASK)	(150)	LPVFPLVALMAEKLITRKLIGEHVVILLHIIITTSIAIVYPVVVTLKCDSA
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(151)	LPVFPLVALMAEKLITRKLIGEHVVILLHIIITTSIAIVYPVVVTLKCDSA
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(151)	LPVFPLVALMAEKLITRKLIGEHVVILLHIIITTSIAIVYPVVVTLKCDSA
ZmDGAT1-2 (B73)	(151)	LPVFPLVALMAEKLITRKLIGEHVVILLHIIITTSIAIVYPVVVTLKCDSA
Consenso	(151)	LPVFPLVALMAEKLITRKLIGEHVVILLHIIITTSIAIVYPVVVTLKCDSA
	201	250
ZmDGAT1-2 (ASK)	(200)	VLSGFVLMFLASIMWMKLVSYAHTNYDIRVLSKSTEKGAAYGNYVDPENM
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(201)	VLSGFVLMFLASIMWMKLVSYAHTNYDIRVLSKSTEKGAAYGNYVDPENM
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(201)	VLSGFVLMFLASIMWMKLVSYAHTNYDIRVLSKSTEKGAAYGNYVDPENM
ZmDGAT1-2 (B73)	(201)	VLSGFVLMFLASIMWMKLVSYAHTNYDIRVLSKSTEKGAAYGNYVDPENM
Consenso	(201)	VLSGFVLMFLASIMWMKLVSYAHTNYDIRVLSKSTEKGAAYGNYVDPENM
	251	300
ZmDGAT1-2 (ASK)	(250)	KDPTFKSLVYFMLAPTLCYQPTYPTTCIRKGWVTQQLIKCVVFTGLMGE
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(251)	KDPTFKSLVYFMLAPTLCYQPTYPTTCIRKGWVTQQLIKCVVFTGLMGE
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(251)	KDPTFKSLVYFMLAPTLCYQPTYPTTCIRKGWVTQQLIKCVVFTGLMGE
ZmDGAT1-2 (B73)	(251)	KDPTFKSLVYFMLAPTLCYQPTYPTTCIRKGWVTQQLIKCVVFTGLMGE
Consenso	(251)	KDPTFKSLVYFMLAPTLCYQPTYPTTCIRKGWVTQQLIKCVVFTGLMGE
	301	350

FIGURA 30A

ZmDGAT1-2 (ASK)	(300)	IIIEQYINPIVKNSKHPLKGNFLNAIERVLKLSVPTLYVWLCMFYCFFHLW	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(301)	IIIEQYINPIVKNSKHPLKGNFLNAIERVLKLSVPTLYVWLCMFYCFFHLW	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(301)	IIIEQYINPIVKNSKHPLKGNFLNAIERVLKLSVPTLYVWLCMFYCFFHLW	
ZmDGAT1-2 (B73)	(301)	IIIEQYINPIVKNSKHPLKGNFLNAIERVLKLSVPTLYVWLCMFYCFFHLW	
Consenso	(301)	IIIEQYINPIVKNSKHPLKGNFLNAIERVLKLSVPTLYVWLCMFYCFFHLW	351 400
ZmDGAT1-2 (ASK)	(350)	LNIVAEELLCFGDREFYKDWWNAKTVEEYWRMWNMPVHKWIIRHIYFPCIR	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(351)	LNIVAEELLCFGDREFYKDWWNAKTVEEYWRMWNMPVHKWIIRHIYFPCIR	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(351)	LNIVAEELLCFGDREFYKDWWNAKTVEEYWRMWNMPVHKWIIRHIYFPCIR	
ZmDGAT1-2 (B73)	(351)	LNIVAEELLCFGDREFYKDWWNAKTVEEYWRMWNMPVHKWIIRHIYFPCIR	
Consenso	(351)	LNIVAEELLCFGDREFYKDWWNAKTVEEYWRMWNMPVHKWIIRHIYFPCIR	401 450
ZmDGAT1-2 (ASK)	(400)	KGFSRGVAILISFLVSAVFHEICTAVPCHIFKEWAFSGIMEQIPLVFLTR	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(401)	KGFSRGVAILISFLVSAVFHEICTAVPCHIFKEWAFSGIMEQIPLVFLTR	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(401)	KGFSRGVAILISFLVSAVFHEICTAVPCHIFKEWAFSGIMEQIPLVFLTR	
ZmDGAT1-2 (B73)	(401)	KGFSRGVAILISFLVSAVFHEICTAVPCHIFKEWAFSGIMEQIPLVFLTR	
Consenso	(401)	KGFSRGVAILISFLVSAVFHEICTAVPCHIFKEWAFSGIMEQIPLVFLTR	451 495
ZmDGAT1-2 (ASK)	(450)	YLHATFKHVMVGNMIFWFFFSIVGQPMCVLLYYHDVMNRQAQASR	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(451)	YLHATFKHVMVGNMIFWFF-SIVGQPMCVLLYYHDVMNRQAQASR	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(451)	YLHATFKHVMVGNMIFWFF-SIVGQPMCVLLYYHDVMNRQAQASR	
ZmDGAT1-2 (B73)	(451)	YLHATFKHVMVGNMIFWFF-SIVGQPMCVLLYYHDVMNRQAQASR	
Consenso	(451)	YLHATFKHVMVGNMIFWFF SIVGQPMCVLLYYHDVMNRQAQASR	

FIGURA 30B

Alinhamentos de DNA de ORF de ZmDGAT1-2

	1	50
ZmDGAT1-2 (ASK)	(1) ATGGCCCCGGCCCCCTCCATGCCTGCCGCTCCGATCGCGCCGGCCCTGG	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(1) ATGGCCCCGGCCCCCTCCATGCCTGCCGCTCCGATCGCGCCGGCCCTGG	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(1) ATGGCCCCGGCCCCCTCCATGCCTGCCGCTCCGATCGCGCCGGCCCTGG	
ZmDGAT1-2 (B73)	(1) ATGGCCCCGGCCCCCTCCATGCCTGCCGCTCCGATCGCGCCGGCCCTGG	
Consenso	(1) ATGGCCCCGGCCCCCTCCATGCCTGCCGCTCCGATCGCGCCGGCCCTGG	
	51	100
ZmDGAT1-2 (ASK)	(51) CCGGACGCGGGGGAAGTCTGCTCTCCCTTGGCTCCGCGCGCCCCCTCAG	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(51) CCGGACGCGGGGGAAGTCTGCTCTCCCTTGGCTCCGCGCGCCCCCTCAG	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(51) CCGGACGCGGGGGAAGTCTGCTCTCCCTTGGCTCCGCGCGCCCCCTCAG	
ZmDGAT1-2 (B73)	(51) CCGGACGCGGGGGAAGTCTGCTCTCCCTTGGCTCCGCGCGCCCCCTCAG	
Consenso	(51) CCGGACGCGGGGGAAGTCTGCTCTCCCTTGGCTCCGCGCGCCCCCTCAG	
	101	150
ZmDGAT1-2 (ASK)	(101) CCGACGCGGGGACCTTGCCGGCGATTCTCGGGAGGCTTGCGGGAGAAC	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(101) CCGACGCGGGGACCTTGCCGGCGATTCTCGGGTAGGCTTGCGGGAGAAC	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(101) CCGACGCGGGGACCTTGCCGGCGATTCTCGGGTAGGCTTGCGGGAGAAC	
ZmDGAT1-2 (B73)	(101) CCGACGCGGGGACCTTGCCGGCGATTCTCGGGTAGGCTTGCGGGAGAAC	
Consenso	(101) CCGACGCGGGGACCTTGCCGGCGATTCTCGGGTAGGCTTGCGGGAGAAC	
	151	200
ZmDGAT1-2 (ASK)	(151) GGCGAGCCGCAATCCGCGACGAATCCGCGCCCGCAGGAGCAGCAGCAG--	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(151) GGCGAGCCGCAATCCGCGACGAATCCGCGCCCGCAGGAGCAGCAGCAGCA	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(151) GGCGAGCCGCAATCCGCGACGAATCCGCGCCCGCAGGAGCAGCAGCAGCA	
ZmDGAT1-2 (B73)	(151) GGCGAGCCGCAATCCGCGACGAATCCGCGCCCGCAGGAGCAGCAGCAGCA	
Consenso	(151) GGCGAGCCGCAATCCGCGACGAATCCGCGCCCGCAGGAGCAGCAGCAGCA	
	201	250
ZmDGAT1-2 (ASK)	(199) -CACGAGATGCTATACTACCGCGCGTCGGCGCCCGCCACCGCCGCGTCA	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(201) GCACGAGATGCTATACTACCGCGCGTCGGCGCCCGCCACCGCCGCGTCA	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(201) GCACGAGATGCTATACTACCGCGCGTCGGCGCCCGCCACCGCCGCGTCA	
ZmDGAT1-2 (B73)	(201) GCACGAGATGCTATACTACCGCGCGTCGGCGCCCGCCACCGCCGCGTCA	
Consenso	(201) GCACGAGATGCTATACTACCGCGCGTCGGCGCCCGCCACCGCCGCGTCA	
	251	300
ZmDGAT1-2 (ASK)	(248) AGGAGAGCCCCCTCAGCTCTGACGCCATCTTCCGGCAGAGCCATGCTGGT	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(251) AGGAGAGCCCCCTCAGCTCTGACGCCATCTTCCGGCAGAGCCATGCTGGT	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(251) AGGAGAGCCCCCTCAGCTCTGACGCCATCTTCCGGCAGAGCCATGCTGGT	
ZmDGAT1-2 (B73)	(251) AGGAGAGCCCCCTCAGCTCTGACGCCATCTTCCGGCAGAGCCATGCTGGT	
Consenso	(251) AGGAGAGCCCCCTCAGCTCTGACGCCATCTTCCGGCAGAGCCATGCTGGT	
	301	350
ZmDGAT1-2 (ASK)	(298) CTTCTGAATCTATGCATTGTTGTTCTGATCGCAGTGAACAGCAGACTCAT	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(301) CTTCTGAATCTATGCATTGTTGTTCTGATCGCAGTGAACAGCAGACTCAT	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(301) CTTCTGAATCTATGCATTGTTGTTCTGATCGCAGTGAACAGCAGACTCAT	
ZmDGAT1-2 (B73)	(301) CTTCTGAATCTATGCATTGTTGTTCTGATCGCAGTGAACAGCAGACTCAT	
Consenso	(301) CTTCTGAATCTATGCATTGTTGTTCTGATCGCAGTGAACAGCAGACTCAT	
	351	400

FIGURA 31A

ZmDGAT1-2 (ASK)	(348)	TATTGAGAATTTAAATGAAGTATGGCCTGTTGATAAAGAGCTGGATTTTGGT	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(351)	TATTGAGAATTTAAATGAAGTATGGCCTGTTGATAAAGAGCTGGATTTTGGT	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(351)	TATTGAGAATTTAAATGAAGTATGGCCTGTTGATAAAGAGCTGGATTTTGGT	
ZmDGAT1-2 (B73)	(351)	TATTGAGAATTTAAATGAAGTATGGCCTGTTGATAAAGAGCTGGATTTTGGT	
Consenso	(351)	TATTGAGAATTTAAATGAAGTATGGCCTGTTGATAAAGAGCTGGATTTTGGT	401 450
ZmDGAT1-2 (ASK)	(398)	TTAGTGCAAGATCGCTGGGTGACTGGCCCCCTTCTAATGTGCTGCCTCACT	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(401)	TTAGTGCAAGATCGCTGGGTGACTGGCCCCCTTCTAATGTGCTGCCTCACT	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(401)	TTAGTGCAAGATCGCTGGGTGACTGGCCCCCTTCTAATGTGCTGCCTCACT	
ZmDGAT1-2 (B73)	(401)	TTAGTGCAAGATCGCTGGGTGACTGGCCCCCTTCTAATGTGCTGCCTCACT	
Consenso	(401)	TTAGTGCAAGATCGCTGGGTGACTGGCCCCCTTCTAATGTGCTGCCTCACT	451 500
ZmDGAT1-2 (ASK)	(448)	CTACCAAGTTTTCCCACTAGTTGCACTCATGGCTGAGAAGCTGATCACAAG	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(451)	CTACCAAGTTTTCCCACTAGTTGCACTCATGGCTGAGAAGCTGATCACAAG	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(451)	CTACCAAGTTTTCCCACTAGTTGCACTCATGGCTGAGAAGCTGATCACAAG	
ZmDGAT1-2 (B73)	(451)	CTACCAAGTTTTCCCACTAGTTGCACTCATGGCTGAGAAGCTGATCACAAG	
Consenso	(451)	CTACCAAGTTTTCCCACTAGTTGCACTCATGGCTGAGAAGCTGATCACAAG	501 550
ZmDGAT1-2 (ASK)	(498)	AAAGCTCATTGGTGAACATGTGGTTATTCTACTCCATATCATTATTACAA	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(501)	AAAGCTCATTGGTGAACATGTGGTTATTCTACTCCATATCATTATTACAA	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(501)	AAAGCTCATTGGTGAACATGTGGTTATTCTACTCCATATCATTATTACAA	
ZmDGAT1-2 (B73)	(501)	AAAGCTCATTGGTGAACATGTGGTTATTCTACTCCATATCATTATTACAA	
Consenso	(501)	AAAGCTCATTGGTGAACATGTGGTTATTCTACTCCATATCATTATTACAA	551 600
ZmDGAT1-2 (ASK)	(548)	CATCTGCCATTGTCTATCCAGTTGTTGTGACTCTTAAGTGTGACTCAGCA	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(551)	CATCTGCCATTGTCTATCCAGTTGTTGTGACTCTTAAGTGTGACTCAGCA	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(551)	CATCTGCCATTGTCTATCCAGTTGTTGTGACTCTTAAGTGTGACTCAGCA	
ZmDGAT1-2 (B73)	(551)	CATCTGCCATTGTCTATCCAGTTGTTGTGACTCTTAAGTGTGACTCAGCA	
Consenso	(551)	CATCTGCCATTGTCTATCCAGTTGTTGTGACTCTTAAGTGTGACTCAGCA	601 650
ZmDGAT1-2 (ASK)	(598)	GTACTATCTGGATTGTGCTAATGTTTCTTGCGAGCATCATGTGGATGAA	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(601)	GTACTATCTGGATTGTGCTAATGTTTCTTGCGAGCATCATGTGGATGAA	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(601)	GTACTATCTGGATTGTGCTAATGTTTCTTGCGAGCATCATGTGGATGAA	
ZmDGAT1-2 (B73)	(601)	GTACTATCTGGATTGTGCTAATGTTTCTTGCGAGCATCATGTGGATGAA	
Consenso	(601)	GTACTATCTGGATTGTGCTAATGTTTCTTGCGAGCATCATGTGGATGAA	651 700
ZmDGAT1-2 (ASK)	(648)	GCTTGTCTCTTATGCACATACAAATTATGATATAAGGGTATTGTCCAAAA	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(651)	GCTTGTCTCTTATGCACATACAAATTATGATATAAGGGTATTGTCCAAAA	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(651)	GCTTGTCTCTTATGCACATACAAATTATGATATAAGGGTATTGTCCAAAA	
ZmDGAT1-2 (B73)	(651)	GCTTGTCTCTTATGCACATACAAATTATGATATAAGGGTATTGTCCAAAA	
Consenso	(651)	GCTTGTCTCTTATGCACATACAAATTATGATATAAGGGTATTGTCCAAAA	701 750

FIGURA 31B

ZmDGAT1-2 (ASK)	(698)	GTACTGAAAAGGGTGCCTGCATATGGAAATTATGTCGATCCTGAGAATATG	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(701)	GTACTGAGAAGGGTGCCTGCATATGGAAATTATGTCGATCCTGAGAATATG	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(701)	GTACTGAGAAGGGTGCCTGCATATGGAAATTATGTCGATCCTGAGAATATG	
ZmDGAT1-2 (B73)	(701)	GTACTGAGAAGGGTGCCTGCATATGGAAATTATGTCGATCCTGAGAATATG	
Consenso	(701)	GTACTGAGAAGGGTGCCTGCATATGGAAATTATGTCGATCCTGAGAATATG	751 800
ZmDGAT1-2 (ASK)	(748)	AAAGATCCAACCTTTAAAAGTCTAGTGTACTTTATGTTGGCCCCAACACT	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(751)	AAAGATCCAACCTTTAAAAGTCTAGTGTACTTCATGTTGGCCCCAACACT	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(751)	AAAGATCCAACCTTTAAAAGTCTAGTGTACTTCATGTTGGCCCCAACACT	
ZmDGAT1-2 (B73)	(751)	AAAGATCCAACCTTTAAAAGTCTAGTGTACTTCATGTTGGCCCCAACACT	
Consenso	(751)	AAAGATCCAACCTTTAAAAGTCTAGTGTACTTCATGTTGGCCCCAACACT	801 850
ZmDGAT1-2 (ASK)	(798)	TTGTTACCAGCCAACTTATCCTCAAACACATGTATTAGAAAAGGTTGGG	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(801)	TTGTTACCAGCCAACTTATCCTCAAACACATGTATTAGAAAAGGTTGGG	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(801)	TTGTTACCAGCCAACTTATCCTCAAACACATGTATTAGAAAAGGTTGGG	
ZmDGAT1-2 (B73)	(801)	TTGTTACCAGCCAACTTATCCTCAAACACATGTATTAGAAAAGGTTGGG	
Consenso	(801)	TTGTTACCAGCCAACTTATCCTCAAACACATGTATTAGAAAAGGTTGGG	851 900
ZmDGAT1-2 (ASK)	(848)	TGACCCAGCAACTCATAAAGTGCCTGGTTTTTACAGGCTTGATGGGCTTC	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(851)	TGACCCAGCAACTCATAAAGTGCCTGGTTTTTACAGGCTTGATGGGCTTC	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(851)	TGACCCAGCAACTCATAAAGTGCCTGGTTTTTACAGGCTTGATGGGCTTC	
ZmDGAT1-2 (B73)	(851)	TGACCCAGCAACTCATAAAGTGCCTGGTTTTTACAGGCTTGATGGGCTTC	
Consenso	(851)	TGACCCAGCAACTCATAAAGTGCCTGGTTTTTACAGGCTTGATGGGCTTC	901 950
ZmDGAT1-2 (ASK)	(898)	ATAATTGAGCAATATATAAAACCAATTGTGAAGAATTCCAAACATCCACT	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(901)	ATAATTGAGCAATATATAAAACCAATTGTGAAGAATTCCAAACATCCACT	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(901)	ATAATTGAGCAATATATAAAACCAATTGTGAAGAATTCCAAACATCCACT	
ZmDGAT1-2 (B73)	(901)	ATAATTGAGCAATATATAAAACCAATTGTGAAGAATTCCAAACATCCACT	
Consenso	(901)	ATAATTGAGCAATATATAAAACCAATTGTGAAGAATTCCAAACATCCACT	951 1000
ZmDGAT1-2 (ASK)	(948)	GAAAGGGAATTTTTTGAATGCTATAGAAAGAGTCTTAAAACTCTCAGTGC	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(951)	GAAAGGGAATTTTTTGAATGCTATAGAAAGAGTCTTAAAACTCTCAGTGC	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(951)	GAAAGGGAATTTTTTGAATGCTATAGAAAGAGTCTTAAAACTCTCAGTGC	
ZmDGAT1-2 (B73)	(951)	GAAAGGGAATTTTTTGAATGCTATAGAAAGAGTCTTAAAACTCTCAGTGC	
Consenso	(951)	GAAAGGGAATTTTTTGAATGCTATAGAAAGAGTCTTAAAACTCTCAGTGC	1001 1050
ZmDGAT1-2 (ASK)	(998)	CAACATTATATGTATGGCTTTGCATGTTCTATTGCTTTTTTCATTTATGG	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(1001)	CAACATTATATGTATGGCTTTGCATGTTCTATTGCTTTTTTCATTTATGG	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(1001)	CAACATTATATGTATGGCTTTGCATGTTCTATTGCTTTTTTCATTTATGG	
ZmDGAT1-2 (B73)	(1001)	CAACATTATATGTATGGCTTTGCATGTTCTATTGCTTTTTTCATTTATGG	
Consenso	(1001)	CAACATTATATGTATGGCTTTGCATGTTCTATTGCTTTTTTCATTTATGG	1051 1100

FIGURA 31C

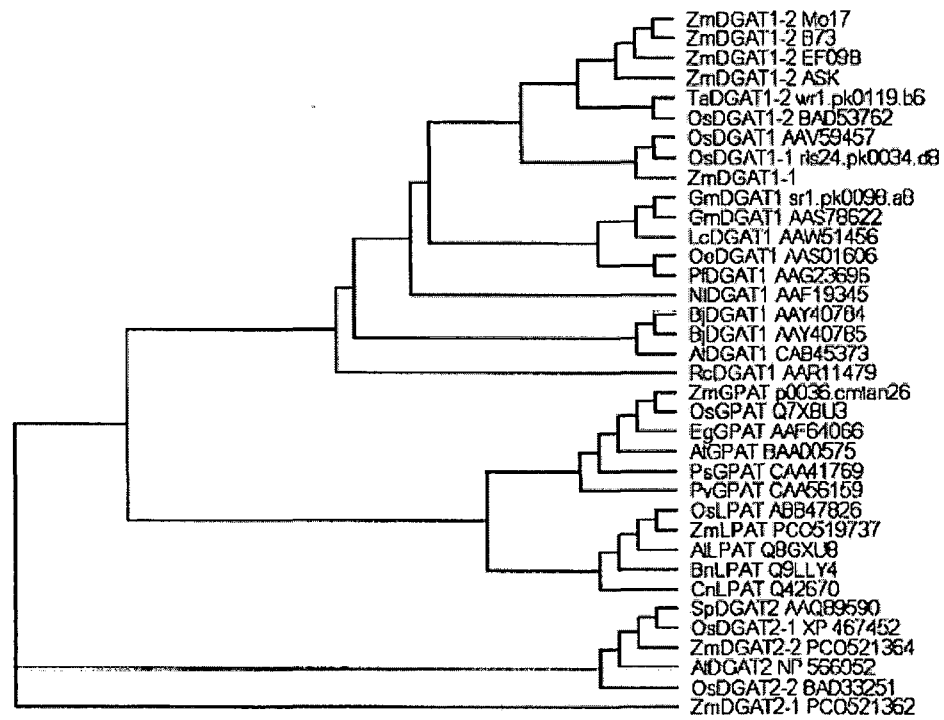
ZmDGAT1-2 (ASK)	(1048)	CTGAACATTGTAGCTGAACTCCTCTGTTTCGGTGACCGTGAATTCTATAA
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(1051)	CTGAACATTGTAGCTGAACTCCTCTGTTTCGGTGACCGTGAATTCTATAA
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(1051)	CTGAACATTGTAGCTGAACTCCTCTGTTTCGGTGACCGTGAATTCTATAA
ZmDGAT1-2 (B73)	(1051)	CTGAACATTGTAGCTGAACTCCTCTGTTTCGGTGACCGTGAATTCTATAA
Consenso	(1051)	CTGAACATTGTAGCTGAACTCCTCTGTTTCGGTGACCGTGAATTCTATAA 1101 1150
ZmDGAT1-2 (ASK)	(1098)	GGACTGGTGGGAATGCCAAAACGTGTTGAAGAGTACTGGAGGATGTGGGAACA
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(1101)	GGACTGGTGGGAATGCCAAAACGTGTTGAAGAGTACTGGAGGATGTGGGAACA
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(1101)	GGACTGGTGGGAATGCCAAAACGTGTTGAAGAGTACTGGAGGATGTGGGAACA
ZmDGAT1-2 (B73)	(1101)	GGACTGGTGGGAATGCCAAAACGTGTTGAAGAGTACTGGAGGATGTGGGAACA
Consenso	(1101)	GGACTGGTGGGAATGCCAAAACGTGTTGAAGAGTACTGGAGGATGTGGGAACA 1151 1200
ZmDGAT1-2 (ASK)	(1148)	TGCCTGTTTCATAAGTGGATCATCAGACACATATATTTTCCATGTATAAGG
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(1151)	TGCCTGTTTCATAAGTGGATCATCAGACACATATATTTTCCATGTATAAGG
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(1151)	TGCCTGTTTCATAAGTGGATCATCAGACACATATATTTTCCATGTATAAGG
ZmDGAT1-2 (B73)	(1151)	TGCCTGTTTCATAAGTGGATCATCAGACACATATATTTTCCATGTATAAGG
Consenso	(1151)	TGCCTGTTTCATAAGTGGATCATCAGACACATATATTTTCCATGTATAAGG 1201 1250
ZmDGAT1-2 (ASK)	(1198)	AAAGGCCTTTTCCAGGGGTGTAGCTATTCTAATCTCGTTTCTGGTTTCAGC
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(1201)	AAAGGCCTTTTCCAGGGGTGTAGCTATTCTAATCTCGTTTCTGGTTTCAGC
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(1201)	AAAGGCCTTTTCCAGGGGTGTAGCTATTCTAATCTCGTTTCTGGTTTCAGC
ZmDGAT1-2 (B73)	(1201)	AAAGGCCTTTTCCAGGGGTGTAGCTATTCTAATCTCGTTTCTGGTTTCAGC
Consenso	(1201)	AAAGGCCTTTTCCAGGGGTGTAGCTATTCTAATCTCGTTTCTGGTTTCAGC 1251 1300
ZmDGAT1-2 (ASK)	(1248)	TGTATTTTCATGAGATATGTATTGCGGTGCCGTGCCACATTTTCAAATTCT
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(1251)	TGTATTTTCATGAGATATGTATTGCGGTGCCGTGCCACATTTTCAAATTCT
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(1251)	TGTATTTTCATGAGATATGTATTGCGGTGCCGTGCCACATTTTCAAATTCT
ZmDGAT1-2 (B73)	(1251)	TGTATTTTCATGAGATATGTATTGCGGTGCCGTGCCACATTTTCAAATTCT
Consenso	(1251)	TGTATTTTCATGAGATATGTATTGCGGTGCCGTGCCACATTTTCAAATTCT 1301 1350
ZmDGAT1-2 (ASK)	(1298)	GGGCATTTTCTGGGATCATGTTTCAGATACCGTTGGTATTCTTGACAAGA
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(1301)	GGGCATTTTCTGGGATCATGTTTCAGATACCGTTGGTATTCTTGACAAGA
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(1301)	GGGCATTTTCTGGGATCATGTTTCAGATACCGTTGGTATTCTTGACAAGA
ZmDGAT1-2 (B73)	(1301)	GGGCATTTTCTGGGATCATGTTTCAGATACCGTTGGTATTCTTGACAAGA
Consenso	(1301)	GGGCATTTTCTGGGATCATGTTTCAGATACCGTTGGTATTCTTGACAAGA 1351 1400
ZmDGAT1-2 (ASK)	(1348)	TATCTCCATGCTACGTTCAAGCATGTAATGGTGGGCAACATGATATTTTG
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(1351)	TATCTCCATGCTACGTTCAAGCATGTAATGGTGGGCAACATGATATTTTG
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(1351)	TATCTCCATGCTACGTTCAAGCATGTAATGGTGGGCAACATGATATTTTG
ZmDGAT1-2 (B73)	(1351)	TATCTCCATGCTACGTTCAAGCATGTAATGGTGGGCAACATGATATTTTG
Consenso	(1351)	TATCTCCATGCTACGTTCAAGCATGTAATGGTGGGCAACATGATATTTTG 1401 1450

FIGURA 31D

ZmDGAT1-2 (ASK)	(1398)	GTTCTTCTTCAGTATAGTCGGACAGCCGATGTGTGTCCTTCTATACTACC
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(1401)	GTTCTTC---AGTATAGTCGGACAGCCGATGTGTGTCCTTCTATACTACC
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(1401)	GTTCTTC---AGTATAGTCGGACAGCCGATGTGTGTCCTTCTATACTACC
ZmDGAT1-2 (B73)	(1401)	GTTCTTC---AGTATAGTCGGACAGCCGATGTGTGTCCTTCTATACTACC
Consenso	(1401)	GTTCTTC AGTATAGTCGGACAGCCGATGTGTGTCCTTCTATACTACC 1451 1488
ZmDGAT1-2 (ASK)	(1448)	ATGACGTCATGAACAGGCAGGCCCAGGCCAAGTAGATAG
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(1448)	ATGACGTCATGAACAGGCAGGCCCAGGCCAAGTAGATAG
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(1448)	ATGACGTCATGAACAGGCAGGCCCAGGCCAAGTAGATAG
ZmDGAT1-2 (B73)	(1448)	ATGACGTCATGAACAGGCAGGCCCAGGCCAAGTAGATAG
Consenso	(1451)	ATGACGTCATGAACAGGCAGGCCCAGGCCAAGTAGATAG

FIGURA 31E

FIGURA 32



ZmDGAT1-2 (ASK)	(1)	-----MAPPFS-----MPAASDRAGPGRD-----AGDSS
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(1)	-----MAPPFS-----MPAASDRAGPGRD-----AGDSS
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(1)	-----MAPPFS-----MPAASDRAGPGRD-----AGDSS
ZmDGAT1-2 (B73)	(1)	-----MAPPFS-----MPAASDRAGPGRD-----AGDSS
OsDGAT1-2 (BAD53762)	(1)	-----MAPPFS-----LAPDRGGGE-----PDDAL
TaDGAT1-2 (wrl.pk0119.b6)	(1)	MSKGNPDPLPGSFLPSHGPPPKPKTPPRTERNLPSSTHGA-----PSVAA
ZmDGAT1-1	(1)	-----MADEDAFPAVHRRP-----PPARC-----AAAQGFAA
OsDGAT1 (AAV59457)	(1)	-----MVGSDDGDDGGGGEAHAPAAPAHHRPPRPGGS-----GAIVEGFAA
OsDGAT1-1 (x1s24.pk0034.d8)	(1)	-----MVGSDDGDDGGGGEAHAGG-----PRRR-----AG
GmDGAT (srl.pk0098.a8)	(1)	-----MAISDEPE-----SVATALNHSSLRRRPS-----ATSTAG
GmDGAT1 (AAS78622)	(1)	-----MAISDEPE-----TVATALNHSSLRRRP-----TAAG
LcDGAT1 (AAW51456)	(1)	-----MAISEDESFLPAAASSVIQSGSSVRRRP-----SAIS
OsDGAT1 (AAS01606)	(1)	-----MTIPELPESETTLNLSHNSRAASTVRRR-----SIDVAVLESNS
PfDGAT1 (AAG23696)	(1)	-----MAILDSPEILDTSSSADNGAAHHTTLRRRQSARSVPPLDSDSN
NtDGAT (AAF19345)	(1)	-----MVIMELPESEVMTTTTTSIGIENLNSDIN-----HSVRRRR-GSN
BjDGAT1 (AAY40784)	(1)	-----MAILDSGVAVPPTENG-----VADLRLHARRKS-----RSDSSNG
BjDGAT1 (AAY40785)	(1)	-----MAILDSG-TVTMATENG-----VADLRLHARRKS-----RSDSSNG
AtDGAT1 (CAB45373)	(1)	-----MAILDSAGVTVTENGSGGFVLDLRLARRKS-----RSDSSNG
RcDGAT1 (AAR11479)	(1)	-----MTILETPELGVISSSAT-----SDINLSLARRR-----TSNDGDD
ZmGPAT (p0036.cmtan26)	(1)	-----
OsGPAT (Q7XBU3)	(1)	-----
EgGPAT (AAS64066)	(1)	-----
AtGPAT (BAA00575)	(1)	-----
PsgPAT (CAA41769)	(1)	-----
PvGPAT (CAAS6159)	(1)	-----
OsLPAT (ABB47826)	(1)	-----
ZmLPAT (PC0519737)	(1)	-----
AtLLPAT (Q8GXU8)	(1)	-----
BnLPAT (Q9LLY4)	(1)	-----
CnLPAT (Q42670)	(1)	-----
SpDGAT2 (AAQ89590)	(1)	-----
OsDGAT2-1 (XP_467452)	(1)	-----
ZmDGAT2-2 (PC0521364)	(1)	-----
AtDGAT2 (NP_566952)	(1)	-----
OsDGAT2-2 (BAD33251)	(1)	-----
ZmDGAT2-1 (PC0521362)	(1)	-----
ZmDGAT1-2 (ASK)	(25)	SLRLRRAPSDAGDLAGDSSVGLRENGEPQPTNFPPEQQQ-----
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(25)	SLRLRRAPSDAGDLAGDSSVGLRENGEPQPTNFPPEQQQ-----
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(25)	SLRLRRAPSDAGDLAGDSSVGLRENGEPQPTNFPPEQQQ-----
ZmDGAT1-2 (B73)	(25)	SLRLRRAPSDAGDLAGDSSVGLRENGEPQPTNFPPEQQQ-----
OsDGAT1-2 (BAD53762)	(21)	RLRRAAAAAGDAPAPQQQQQRK-----QEQQQQ-----
TaDGAT1-2 (wrl.pk0119.b6)	(50)	ATIATTPPSASAPLPPTVHGEAANGA-----AAAARR-----
ZmDGAT1-1	(31)	ALRRRLRSGMAVAARASFAADSGDESGPGEPTSSRRR-----DNSSG-----ASSAAG
OsDGAT1-1 (x1s24.pk0034.d8)	(45)	ALRRRLRSGMAAAARASFGDSSGDEASGEPSSSSSSSSPSRRRGGGGRKCARASSAAGGG
GmDGAT (srl.pk0098.a8)	(26)	QLRGLRL-----DEAATGSPPRPRER-F-RPRGGDSNGRQVLRPGGGGG
GmDGAT1 (AAS78622)	(31)	LFNSPETTDSGGDLAKDSGS-----DSSINSDAAVNSQQQNE-----KQD
LcDGAT1 (AAW51456)	(28)	LFNSPETTDSGGDLAKDSGS-----DSSINSDAAVNSQQQNE-----KQD
OsDGAT1 (AAS01606)	(35)	AVATVEDESSEEPVVRDSSGSDVDSVSSHQHVSPATANREK-----NQV
PfDGAT1 (AAG23696)	(42)	GLEAV-----NDSDDVNMNTNEMNLGGVVEALEETSLGTGLNNOKEENPHVATQESN
NtDGAT (AAF19345)	(46)	SLEAESAINDSNVRNDANLIENLRGGAYESENKQESYKKE-----EGAKVKEGETSNGN
BjDGAT1 (AAY40784)	(40)	GFEAASAINSDANMSDDRDRVCGSGAGLETYNERSKSYGESDVIKEDDRNDNVANGE
BjDGAT1 (AAY40785)	(37)	LLS-----DTSPSDDVGAARERDRVDSAAEEAAGTANLAGG-----DAETRESAGG
AtDGAT1 (CAB45373)	(36)	LLS-----ETSPSDDAGAPADVEDRVS-A-----AQGTANLAG-----DTETRESGGGG
RcDGAT1 (AAR11479)	(39)	LLSGSDNNSPSDDVGAADVRDRIDSVYNDDAQGTANLAGDNNCGG-DNNGGGRGGGG
ZmGPAT (p0036.cmtan26)	(37)	ALADLASKFDDDDVRSDESAENIIEFPVAAVTELATAKSNGKDCVANSNKDKDISHGG
OsGPAT (Q7XBU3)	(1)	-----
EgGPAT (AAS64066)	(1)	-----MQAPPLASSPSPAW-----
AtGPAT (BAA00575)	(1)	MLVPSAI.PRVRSVSAAAPSVSGVGSPPALSSRSCTSLDSSVR-----
PsgPAT (CAA41769)	(1)	-----MLTFSSSAATVAVAAATVTSSARVPVYPLASSTLRGL-----
PvGPAT (CAAS6159)	(3)	DSEFAHCASHIN-----YRHQKMTMFIESTPCCSPTAFESP-----F-----
OsLPAT (ABB47826)	(5)	GSSAYYVANAIPFLRLSNKTMLLSTPPTTFFPTSTTPRVTL-----
ZmLPAT (PC0519737)	(1)	-----MUTLLRPRPLAHAAGAGD-----
AtLLPAT (Q8GXU8)	(1)	-----MUTLLRPRPLAHAAGAGD-----
BnLPAT (Q9LLY4)	(1)	-----MDVASARSISHPYSYKPKICS-----
CnLPAT (Q42670)	(1)	-----MDVASARGVSSHPPYSSKPKICS-----
SpDGAT2 (AAQ89590)	(1)	-----
OsDGAT2-1 (XP_467452)	(1)	-----MNGEBRE-----
ZmDGAT2-2 (PC0521364)	(1)	-----MGAGNGEVRYG-----GGGAGAGEA-----
AtDGAT2 (NP_566952)	(1)	-----MGADGGLNRAAEKPRDG-----
OsDGAT2-2 (BAD33251)	(1)	-----
ZmDGAT2-1 (PC0521362)	(1)	-----MGANGNDVYAAAAAGESPMGAA-----
	(1)	-----MGAGTN-----NGLSNGAAA-----

FIGURA 33A

		1
ZmDGAT1-2 (ASK)	(67)	-----HEMLYYRASAPAHRRVKESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(68)	-----HEMLYYRASAPAHRRVKESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(68)	-----HEMLYYRASAPAHRRVKESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
ZmDGAT1-2 (B73)	(68)	-----HEMLYYRASAPAHRRVKESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
OsDGAT1-2 (BAD53762)	(61)	-----LLWYRASAPAHRRVKESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
TaDGAT1-2 (wrl.pk0119.b6)	(83)	-----DALLPGVGAHRRVKESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
ZmDGAT1-1	(79)	G---RAGAGDPSAFTFRAAAPVHRKAKESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
OsDGAT1 (AAV59457)	(105)	G---RGGGGDPSAFTFRAAAPVHRKAKESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
OsDGAT1-1 (rls24.pk0034.d8)	(68)	-----RGGGGDPSAFTFRAAAPVHRKAKESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
GmDGAT (arl.pk0098.a8)	(74)	T-----DPSVLKFAYRPSVPAMRKVKESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
GmDGAT1 (AAS78622)	(68)	T-----DPSVLKFAYRPSVPAMRKVKESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
LcDGAT1 (AAW51456)	(81)	H-----DISATKFAIRPSAPAHRRVKESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
OsDGAT1 (AAS01606)	(99)	QEM---EVLASAKFAHRPSAPVHRRIKESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
PDGAT1 (AAG23696)	(103)	G-----TDVMAYKFTFRAAPAHRRKAKESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
NcDGAT (AAF19345)	(100)	ESKSTETTTTPFKFAYRASAPAHRRKESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
BjDGAT1 (AAY40784)	(85)	-----DVRFTYRPSVPAMRRRTRESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
BjDGAT1 (AAY40785)	(81)	-----GNGEVRYTYRPSVPAMRRRTRESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
AtDGAT1 (CAB45373)	(98)	R-----GNADATPTTYRPSVPAMRRRESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
RcDGAT1 (AAR11479)	(96)	-----SSDFKLAYRPSVPAMRRRESPLSSDAIFRQSHAGLNLNCIVVLIIVNSRLI
ZmGPAT (p0036.cmtan26)	(1)	-----
OsGPAT (Q7XBU3)	(15)	-----TAILPAPARLCCSRK-----GALRLKAAHRAAPARGPRVPAKGAVL
EgGPAT (AAF64066)	(44)	-----SSLRRCFCGIYTSRTKA-----VVENVESKASAREMRSAYKRAVLASDTGA
AtGPAT (BAA00575)	(39)	-----VSFRITAKKFLPLPLRSGGVSVRAMELVQDKESVAASIAFNEARGET
PgGPAT (CAA41769)	(40)	-----RASNSKPLRSTLSLRSSIS-----SSSITSTSHCSIAFNIVKHKEKHVYSAN
PvGPAT (CAA56159)	(48)	-----LSTSSSSSSSISLRSTAP-----SPSCSSVTPKNCINLASAKHSPP-----N
OsLPAT (ABB47826)	(19)	-----ATPSTAHAVVVSQGRGR-----GVCEQPHRVRRRPPQP-----VAVATASHR
ZmLPAT (PC0519737)	(19)	-----PSSSAHVAVVQGGARS-----LRHRVSVSVVFRSPS-----TQVLATHR
AtLLPAT (Q8GXU8)	(23)	-----SQSSLIRISRDVCCFCGICNGMTSTTSLHAFVSEKEMGETRRTYTCMS
BnLPAT (Q9LLY4)	(23)	-----BQSSLIRIPISGCCFAPSNNLITSLHAASRGVTR-----RTSGVQWC
CnLPAT (Q42670)	(1)	-----MDASGASSFLRGRCLESCFKASFGMSQPKDAAGQ-----
SpDGAT2 (AAQ89590)	(9)	-----PAPETVVVKAGRS-----AIRSLVATHLMVCPIALT-----
OsDGAT2-1 (XP_467452)	(21)	-----AVMADDGTTVFRGTAP-----PVRTVALALNLCAIHFN-----
ZmDGAT2-2 (PC0521364)	(18)	-----EGGEARVFRCTOYS-----LPTTVALALNLGCIHFN-----
AtDGAT2 (NP_566952)	(1)	-----MGGSREFRAEHSNQFHSIIMAINWLGAIHFN-----
OsDGAT2-2 (BAD33251)	(23)	-----RVVAROGATVFRGADYS-----LPTTVALALNLGCIHFN-----
ZmDGAT2-1 (PC0521362)	(16)	-----GQRADDGTTVFRGTAYS-----PLRTVALALNLGCIHFN-----
		2
ZmDGAT1-2 (ASK)	(117)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(118)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(118)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
ZmDGAT1-2 (B73)	(118)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
OsDGAT1-2 (BAD53762)	(99)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
TaDGAT1-2 (wrl.pk0119.b6)	(131)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
ZmDGAT1-1	(136)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
OsDGAT1 (AAV59457)	(141)	-----YGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
OsDGAT1-1 (rls24.pk0034.d8)	(124)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
GmDGAT (arl.pk0098.a8)	(128)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
GmDGAT1 (AAS78622)	(122)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
LcDGAT1 (AAW51456)	(134)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
OsDGAT1 (AAS01606)	(156)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
PDGAT1 (AAG23696)	(158)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
NcDGAT (AAF19345)	(160)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
BjDGAT1 (AAY40784)	(135)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
BjDGAT1 (AAY40785)	(135)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
AtDGAT1 (CAB45373)	(152)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
RcDGAT1 (AAR11479)	(148)	IENLMKYGLLIRAGFWFSARSLSLDWPLMCCLTLPVFPLVALMAEKILTRKLGHEHVVL
ZmGPAT (p0036.cmtan26)	(1)	-----
OsGPAT (Q7XBU3)	(57)	ASEVVGPSPLDARNEQELILHIRKEVERGKLPAVAAHLEELYNNYKDAVMQSRDPNAH
EgGPAT (AAF64066)	(90)	EEVVGHSRSLFARSEELLSYIRKEVETGRLESDIANGLEELLYNNYKDAVMQSRDPNAH
AtGPAT (BAA00575)	(89)	PSRLNHSRTFLDARSEQDLSGKKEEAGRI.PANVAAGMEELYNNYKDAVMQSRDPNAH
PgGPAT (CAA41769)	(87)	MTSSVSSRTFLNAQNEQDVLGKKEVFRAGTL.PASIAAGMEELYNNYKDAVMQSRDPNAH
PvGPAT (CAA56159)	(91)	MSASVSSRTFLNAQNEQDVLGKKEVFRAGTL.PANVAAGMEELYNNYKDAVMQSRDPNAH
OsLPAT (ABB47826)	(61)	RR-----RR-----TVVRSDFAAG-----GAATMGDSAPQALSDIVSVRVRGVC
ZmLPAT (PC0519737)	(61)	RR-----RR-----MVVRSDVVAAGA-----AAAAAGDSTRALPGQQLASVRGVC
AtLLPAT (Q8GXU8)	(73)	NRLRHDFYRFLDKKSPRSSQLARDITVRADL-----SGAATPSSSFPEPEIKLSSRLRGIF
BnLPAT (Q9LLY4)	(66)	YRSIRDFPFKVDKNS-----RTVTVRSDL-----SGAATPSTYFPEPEIKLSSRLRGIC
CnLPAT (Q42670)	(35)	-----P-----SRRPADDDRVDDRWITVILSV
3pDGAT2 (AAQ89590)	(41)	-----AFLCLVALYCR-3TASLNIIGT.LJLVVFPVSDKSKYGRAI
OsDGAT2-1 (XP_467452)	(56)	-----AFLLLASLFLFRRVAAVLAATQLFFMFAVNDMSRLGRKI
ZmDGAT2-2 (PC0521364)	(50)	-----VLLVLSLFLFLSGRAAIVVAFQLLFMFAVNDMSRLGRKI
AtDGAT2 (NP_566952)	(33)	-----VALVLCSLIFLPPSLSLVGLLSLFTIFPIIDRSKYGRKI
OsDGAT2-2 (BAD33251)	(58)	-----VFLVLSLFLFLFRLVAAVVAQQLFMFLPLNDKDKLGRKI
ZmDGAT2-1 (PC0521362)	(51)	-----AFLVLSLFLFRRVAAVLAATQLFFMFLPLSDKSLGRKI

FIGURA 33B

		3
ZmDGAT1-2 (ASK)	(177)	LHIIITTSIAIVPVVTLKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(178)	LHIIITTSIAIVPVVTLKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(178)	LHIIITTSIAIVPVVTLKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
ZmDGAT1-2 (B73)	(178)	LHIIITTSIAIVPVVTLKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
OsDGAT1-2 (BAD53762)	(159)	LHIVITTSVLVYPVVVTLKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
TaDGAT1-2 (wrl.pk0119.b6)	(191)	LHIIITTTVLVYPVVVTLKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
ZmDGAT1-1	(196)	FHILFTTTEIVYPVLVILKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
OsDGAT1 (AAV59457)	(195)	LHIFLSTTEIVYPVLVILKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
OsDGAT1-1 (r1924.pk0034.d8)	(184)	LHIFLSTTEIVYPVLVILKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
GmDGAT (sr1.pk0098.a8)	(188)	LHIIITTSLEYPVLVILKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
GmDGAT1 (AA578622)	(182)	LHIIITTSLEYPVLVILKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
LcDGAT1 (AAW51456)	(193)	LHIFISTAAVYPVLVILKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
OsDGAT1 (AAS01606)	(216)	LHILITTAAILYPVLVILKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
PfDGAT1 (AAG23696)	(218)	LHVITTTVEILFPVVVILKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
NtDGAT (AAP19345)	(220)	LHITITTAAILYPVLVILKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
BjDGAT1 (AA40784)	(195)	LHVITTTVEILFPVVVILKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
BjDGAT1 (AA40785)	(195)	LHIIITTTVEILFPVVVILKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
AtDGAT1 (CAD45373)	(212)	LHIIITTTVEILFPVVVILKCDASVLSGFLMFLASIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
RcDGAT1 (AAR11479)	(208)	LHVITTSAAVLPASVILSCSAFLSGVTIMELACVIMMKLVSYANTNYDIRVLSKSTK
ZmGPAT (p0036.cmtan26)	(1)	-----
OsGPAT (Q7XB03)	(117)	DIVLSNMVALFDCVLLDVENPFTPEPYHKAVERPEPYDMFGQNYIRPLVDYRNSVYGMIS
RqGPAT (AAF64066)	(150)	KILSNMVAFAFRILLDVEDPFTPEPYHKAVERPEPYDMFGQNYIRPLVDYRNSVYGMIS
AtGPAT (BAA00575)	(149)	ETVYSNMVAFAFRILLDVEDPFTPEPYHKAVERPEPYDMFGQNYIRPLVDYRNSVYGMIS
PgGPAT (CAA41769)	(147)	EIVLSNMIALLDRIELDVKEPFEVFAHKKAKREPPEPYDMFGQNYIRPLVDYRNSVYGMIS
PvGPAT (CAA56159)	(151)	EIVLSNMIALLDRIELDVKEPFEVFAHKKAKREPPEPYDMFGQNYIRPLVDYRNSVYGMIS
OsLPAT (ABB47826)	(100)	FFAVTAAVAAIELFVAMVYVHPLVLLFDYRNR-----AQNYIAKIATLTISMFYKL
OsLPAT (PC0519737)	(102)	FILYFAVAAIELFVAMVYVHPLVLLFDYRNR-----AQNYIAKIATLTISMFYKL
AtLLPAT (Q8GXU8)	(130)	FCVWAGISATFLVIMIGHFPVLLFDYRNR-----FHFIATKIASISYIPFYKI
BnLPAT (Q9LLY4)	(116)	ECLVAGISATFLVIMIGHFPVLLFDYRNR-----FHFIATKIASISYIPFYKI
ChLPAT (Q42670)	(60)	RIAACPLSMVTTIVNMIMLILPHFYARIQ-----GNLYGHTGMLMIMINPI
SpDGAT2 (AAQ89590)	(81)	GSEVGRYSPGYFHYVNFEDVKAEDDSRYSVIA-----AEFHSIFPIGAVSLNLT
OsDGAT2-1 (XP_467452)	(97)	AREISKCVIGYFPVTLHVEDYKAFDPNRAVYFG-----YEPHSVLPALGVLELV
ZmDGAT2-2 (PC0521364)	(91)	ARFICRHAGYFPVTLHVEDYKAFDPNRAVYFG-----YEPHSVLPALGVLELV
AtDGAT2 (NP_566952)	(74)	ARYICKHAGYFPVTLHVEDYKAFDPNRAVYFG-----YEPHSVLPALGVLELV
OsDGAT2-2 (BAD33251)	(99)	ARFICRYAGYFPVTLHVEDYKAFDPNRAVYFG-----YEPHSVLPALGVLELV
ZmDGAT2-1 (PC0521362)	(92)	ARFISKYVIGYFPVTLHVEDYKAFDPNRAVYFG-----YEPHSVLPALGVLELV
		4 5 6
ZmDGAT1-2 (ASK)	(237)	GAAYGNYVDPENMKDPTFKSLVYFMIAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(238)	GAAYGNYVDPENMKDPTFKSLVYFMIAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(238)	GAAYGNYVDPENMKDPTFKSLVYFMIAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
ZmDGAT1-2 (B73)	(238)	GAAYGNYVDPENMKDPTFKSLVYFMIAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
OsDGAT1-2 (BAD53762)	(219)	GVTHDISIDPENIKWPTFKSLVYFMIAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
TaDGAT1-2 (wrl.pk0119.b6)	(251)	GATKGSSTDFENIKWPTFKSLVYFMIAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
ZmDGAT1-1	(256)	VDNELTAVGIDNLQAPTFLGSLTYFMIAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
OsDGAT1 (AAV59457)	(255)	VDNELSTVMDNLQAPTFLGSLTYFMIAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
OsDGAT1-1 (r1924.pk0034.d8)	(244)	VDNELSTVMDNLQAPTFLGSLTYFMIAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
GmDGAT (sr1.pk0098.a8)	(248)	GEALLDTLMDYFPVNSFKSLAYFLVAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
GmDGAT1 (AAG70622)	(242)	GEALPDTLMDYFPVNSFKSLAYFLVAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
LcDGAT1 (AAW51456)	(253)	GEALPDTLMDYFPVNSFKSLAYFLVAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
OsDGAT1 (AAS01606)	(276)	GETLSGYMNSDDSYGASFKSLAYFLVAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
PfDGAT1 (AAG23696)	(278)	WEAMSRVYNDYAYDVSFKSLAYFLVAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
NtDGAT (AAP19345)	(280)	DETSDG-----DFSVDYSFKSLAYFLVAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
BjDGAT1 (AA40784)	(255)	VDP-----EISYVSLKSLAYFLVAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
BjDGAT1 (AA40785)	(255)	VDP-----EVSYYVSLKSLAYFLVAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
AtDGAT1 (CAD45373)	(272)	ANP-----EVSYYVSLKSLAYFLVAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
RcDGAT1 (AAR11479)	(269)	EDASNSSS-TEYCHDVSFKTLAYFLVAPTLCYQSYPTTIRKGMVQQLIKCVVTGL
ZmGPAT (p0036.cmtan26)	(1)	-----VWIMSNHQSEADPAIALLLEKTNPHISENIVYVAGDRVVDPLC
OsGPAT (Q7XB03)	(177)	IFQDMQKL-QQGHNVVIMSNHQSEADPAIALLLEKTNPHISENIVYVAGDRVVDPLC
RqGPAT (AAF64066)	(210)	IFSDMEKL-QQGHNVVIMSNHQSEADPAIALLLEKTNPHISENIVYVAGDRVVDPLC
AtGPAT (BAA00575)	(209)	IFSELEKI-QQGHNVVIMSNHQSEADPAIALLLEKTNPHISENIVYVAGDRVVDPLC
PgGPAT (CAA41769)	(207)	LFIQMEQL-QQGHNVVIMSNHQSEADPAIALLLEKTNPHISENIVYVAGDRVVDPLC
PvGPAT (CAA56159)	(211)	LFIQMEKL-QQGHNVVIMSNHQSEADPAIALLLEKTNPHISENIVYVAGDRVVDPLC
OsLPAT (ABB47826)	(152)	DVEGMENLP-PNSSPAVYVAMHQSLDIYTLTLG-----RCFKFISKTSIFMEPII
ZmLPAT (PC0519737)	(154)	EVEGMENLP-PNSSPAVYVAMHQSLDIYTLTLG-----RCFKFISKTSIFMEPII
AtLLPAT (Q8GXU8)	(182)	NIEGLENLP-SSDTFVYVSNHQSLDIYTLTLG-----KSFKTSKTSIFMEPII
BnLPAT (Q9LLY4)	(168)	DIQGLNLP-SSDTFVYVSNHQSLDIYTLTLG-----KSFKTSKTSIFMEPII
ChLPAT (Q42670)	(113)	TIEGSE-----FSNTRAIYICNHASLVDFILHMLIP-----KGTVTIAKKEIWIYPLF
SpDGAT2 (AAQ89590)	(132)	GLMPLTKSK-VLASTAIFCTPFLRQVITWGLVLPAT-R-----KHFPVNLKAGYSCIVP
OsDGAT2-1 (XP_467452)	(148)	GMPLPKIK-VLASSAVFTTFLRQVITWGLVLPAS-R-----KHFPVNLKAGYSCIVP
ZmDGAT2-2 (PC0521364)	(142)	GELPLTKIK-VLASSAVFTTFLRQVITWGLVLPAT-R-----KHFPVNLKAGYSCIVP
AtDGAT2 (NP_566952)	(125)	GMPLPKIK-VLASSAVFTTFLRQVITWGLVLPAS-R-----KHFPVNLKAGYSCIVP
OsDGAT2-2 (BAD33251)	(150)	GMPLPKIK-VLASSAVFTTFLRQVITWGLVLPAT-R-----KHFPVNLKAGYSCIVP
ZmDGAT2-1 (PC0521362)	(143)	GMPLPKIK-VLASSAVFTTFLRQVITWGLVLPAS-R-----KHFPVNLKAGYSCIVP

FIGURA 33C

	7	8	9	10
ZmDGT1-2 (ASK)	(297)	MGFTIEQYINPIYKNSKHPLKGNFLNAIE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
ZmDGT1-2 (EF09B)	(298)	MGFTIEQYINPIYKNSKHPLKGNFLNAIE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
ZmDGT1-2 (Mo17)	(298)	MGFTIEQYINPIYKNSKHPLKGNFLNAIE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
ZmDGT1-2 (B73)	(298)	MGFTIEQYINPIYKNSKHPLKGNFLNAIE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
OsDGT1-2 (BAD53762)	(279)	MGFTIEQYINPIYKNSKHPLKGNFLNAIE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
TaDGT1-2 (wrl.pk0119.b6)	(311)	MGFTIEQYINPIYKNSKHPLKGNFLDAIE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
ZmDGT1-1	(316)	QGFTIEQYINPIYVNSQHPPLKGNLLNAVE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
OsDGT1 (AAV59457)	(315)	QGFTIEQYINPIYVNSQHPPLKGNLLNAVE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
OsDGT1-1 (rls24.pk0034.d8)	(304)	QGFTIEQYINPIYVNSQHPPLKGNLLNAVE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
GmDGT (sr1.pk0098.a8)	(308)	MGFTIEQYINPIYVNSQHPPLKGNLLYATE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
GmDGT1 (AAS78622)	(302)	MGFTIEQYINPIYVNSQHPPLKGNLLYATE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
LcDGT1 (AAW51456)	(313)	MGFTIEQYINPIYVNSQHPPLKGNLLYATE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
OsDGT1 (AAS01606)	(336)	MGFTIEQYINPIYVNSQHPPLKGNLLYATE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
PfDGT1 (AAG23696)	(338)	MGFTIEQYINPIYVNSQHPPLKGNLLYATE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
NtDGT (AAF19345)	(336)	MGFTIEQYINPIYVNSQHPPLKGNLLYATE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
BjDGT1 (AA40784)	(308)	MGFTIEQYINPIYVNSQHPPLKGNLLYATE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
BjDGT1 (AA40785)	(308)	MGFTIEQYINPIYVNSQHPPLKGNLLYATE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
AtDGT1 (CAB45373)	(325)	MGFTIEQYINPIYVNSQHPPLKGNLLYATE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
RcDGT1 (AAR11479)	(327)	MGFTIEQYINPIYVNSQHPPLKGNLLYATE	VLKLSVPTLY	WLCMFY
ZmGPAT (p0036.cmtan26)	(46)	KPFSMGRNLCVYSKKHMDPEL	IEMKRRSNTSLKE	---MALLRSGSQIWIAPSGGR
OsGPAT (Q7XBU3)	(236)	KPFSMGRNLCVYSKKHMDPEL	IEMKRRSNTSLKE	---MALLRSGSQIWIAPSGGR
EgGPAT (AAF64066)	(269)	KPFSMGRNLCVYSKKHMDPEL	IEMKRRSNTSLKE	---MALLRSGSQIWIAPSGGR
AtGPAT (BAA00575)	(268)	KPFSMGRNLCVYSKKHMDPEL	IEMKRRSNTSLKE	---MALLRSGSQIWIAPSGGR
PaGPAT (CAA1769)	(266)	KPFSMGRNLCVYSKKHMDPEL	IEMKRRSNTSLKE	---MALLRSGSQIWIAPSGGR
PvGPAT (CAA56159)	(270)	KPFSMGRNLCVYSKKHMDPEL	IEMKRRSNTSLKE	---MALLRSGSQIWIAPSGGR
OsLPAT (ABB47826)	(203)	G-----WAMYLLGVPLRRMDS	RSQDLCLKR	---CVDLVKKG-ASVFFFPFGTR
ZmLPAT (PCO519737)	(205)	G-----WAMYLLGVPLRRMDS	RSQDLCLKR	---CVDLVKKG-ASVFFFPFGTR
AtLLPAT (Q8GXU8)	(233)	G-----WAMSMGVVPLKRMDS	RSQDLCLKR	---CVDLVKKG-ASVFFFPFGTR
BnLPAT (Q9LLY4)	(219)	G-----WAMSMGVVPLKRMDS	RSQDLCLKR	---CVDLVKKG-ASVFFFPFGTR
CnLPAT (Q42670)	(162)	G-----QLYVLNHHQRI	DRSNPSAATESIKE	---VARAVVKKHLSLIFPFGTR
SpDGT2 (AAQ89590)	(185)	G-----GVQEIIYMNKDY	EVAYLKRRHGFVRVAI	ETGSPVLPVFCFG--
OsDGT2-1 (XP_467452)	(201)	G-----GVQEMLMDHDS	EVAFLKSRKGFVKI	AIQSGCPLVPVFCFG--
ZmDGT2-2 (PCO521364)	(195)	G-----GVREMILHMDHDS	EVAFLKSRKGFVKI	AIQSGCPLVPVFCFG--
AtDGT2 (NP_566952)	(178)	G-----GVQETFMHQDA	ENVFLSRRRGFVR	IAMBQSGPLVPVFCFG--
OsDGT2-2 (BAD33251)	(203)	G-----GVQEILHMDHDS	EIAFLKSRKGFVKI	AMQSGCPLVPVFCFG--
ZmDGT2-1 (PCO521362)	(196)	G-----GVQEILHMDHDS	EVAFLKSRKGFVKI	AIEMQCPVVPVFAFG--
	11	12	13	
ZmDGT1-2 (ASK)	(357)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
ZmDGT1-2 (EF09B)	(358)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
ZmDGT1-2 (Mo17)	(358)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
ZmDGT1-2 (B73)	(358)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
OsDGT1-2 (BAD53762)	(339)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
TaDGT1-2 (wrl.pk0119.b6)	(371)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
ZmDGT1-1	(376)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
OsDGT1 (AAV59457)	(375)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
OsDGT1-1 (rls24.pk0034.d8)	(364)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
GmDGT (sr1.pk0098.a8)	(368)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
GmDGT1 (AAS78622)	(362)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
LcDGT1 (AAW51456)	(373)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
OsDGT1 (AAS01606)	(396)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
PfDGT1 (AAG23696)	(398)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
NtDGT (AAF19345)	(396)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
BjDGT1 (AA40784)	(368)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
BjDGT1 (AA40785)	(368)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
AtDGT1 (CAB45373)	(385)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
RcDGT1 (AAR11479)	(387)	LAFG--DREFYIDWNAKTVEEYWRMNN	IPVHKI	IIRHIYFPCIRKGFGR---GVAIIS
ZmGPAT (p0036.cmtan26)	(104)	DRPNPSSGGEYPAFFDSSAVDMRRLLEHAGVPGHIY	PLSLCYEVMFPQVKEIGE	Q
OsGPAT (Q7XBU3)	(294)	DRPDPLTGEMHAPFDSSAVDMRRLLEHAGVPGHIY	PLSLCYEVMFPQVKEIGE	Q
EgGPAT (AAF64066)	(327)	DRPDPLTGEMHAPFDSSAVDMRRLLEHAGVPGHIY	PLSLCYEVMFPQVKEIGE	Q
AtGPAT (BAA00575)	(326)	DRPNPSTGGEYPAFFDSSAVDMRRLLEHAGVPGHIY	PLSLCYEVMFPQVKEIGE	Q
PaGPAT (CAA1769)	(324)	DRPVANSCEMAPAFDSSAVDMRRLLEHAGVPGHIY	PLSLCYEVMFPQVKEIGE	Q
PvGPAT (CAA56159)	(328)	DRPDQATREWPAPFDSSAVDMRRLLEHAGVPGHIY	PLSLCYEVMFPQVKEIGE	Q
OsLPAT (ABB47826)	(248)	SKDG-KLGAPKRGAFSVATKTGAP	-----	VIPTITLGTGKLMF-----SGME
ZmLPAT (PCO519737)	(250)	SRDG-KLGVEKRGAFSVAAKTGAP	-----	VIPTITLGTGKLMF-----SGME
AtLLPAT (Q8GXU8)	(278)	SKDG-KLGVEKRGAFSVAAKTGAP	-----	VIPTITLGTGKLMF-----SGME
BnLPAT (Q9LLY4)	(264)	SKDG-KLGVEKRGAFSVAAKTGAP	-----	VIPTITLGTGKLMF-----SGME
CnLPAT (Q42670)	(208)	SKTG-KLVEKRGAFSVAAKTGAP	-----	VIPTITLGTGKLMF-----SGME
SpDGT2 (AAQ89590)	(227)	---GAFAPENWPKGGRLYVRLSRAIR	-----	FAPLVYFVGLGSPIP---YRSP
OsDGT2-1 (XP_467452)	(243)	---QSYVYKWRPCKGLVIAIAIK	-----	FTPIIFWKGEGTPIP---FATPM
ZmDGT2-2 (PCO521364)	(237)	---QSYVYKWRPCKGLVIAIAIK	-----	FTPIIFWKGEGTPIP---FATPM
AtDGT2 (NP_566952)	(220)	---QARVYKWKPCDCLYLKLSRAIR	-----	FTPIIFWKGEGTPIP---FATPM
OsDGT2-2 (BAD33251)	(245)	---QSYVYKWRPCKGLVIAIAIK	-----	FTPIIFWKGEGTPIP---FATPM
ZmDGT2-1 (PCO521362)	(238)	---QSYVYKWRPCKGLVIAIAIK	-----	FTPIIFWKGEGTPIP---FATPM

FIGURA 33D

	14	15
ZmDGAT1-2 (ASK)	(412) FLVSAVFHEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFFFSI
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(413) FLVSAVFHEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFF-SI
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(413) FLVSAVFHEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFF-SI
ZmDGAT1-2 (B73)	(413) FLVSAVFHEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFF-SI
OsDGAT1-2 (BAD53762)	(394) YFIVLIDLQLC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFFFSI
TaDGAT1-2 (wrl.pk0119.b6)	(426) FLVSAVFHEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFFFSI
ZmDGAT1-1	(431) FEVSAVLNEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFFFSI
OsDGAT1 (AAV59457)	(423) FLVSAVLNEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFFFSI
OsDGAT1-1 (rls24.pk0034.d8)	(419) FLVSAVLNEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFFFSI
GmDGAT (sr1.pk0098.a8)	(423) FLVSAVLNEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFFFSI
GmDGAT1 (AA978622)	(417) FLVSAVLNEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFFFSI
LcDGAT1 (AAW51456)	(428) FLVSAVLNEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFFFSI
OsDGAT1 (AAS01606)	(451) FLISATFHEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFFFSI
PDGAT1 (AAG23696)	(453) FLVSAVLNEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFFFSI
NcDGAT (AAF19345)	(451) FLVSAVLNEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFFFSI
BjDGAT1 (AAY40784)	(423) FLVSAVLNEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFFFSI
BjDGAT1 (AAY40785)	(423) FLVSAVLNEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFFFSI
AtDGAT1 (CAB45373)	(440) FLVSAVLNEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFFFSI
RcDGAT1 (AAR11479)	(442) FFVSATFHEIC AVPCIIKFWAFSGIMFQIPLVFLTRYLHATEKHYAVGN	IFWFFFSI
ZmGPAT (p0036.cmtan26)	(164) RVISFHGAGLSVTERINYGDIATHTQADEGRELFWNTLYNSVNVQNVLSAIFRGRGA	
OsGPAT (Q7XBU3)	(354) RVISFHGAGLSVTERINYGDIATHTQADEGRELFWNTLYNSVNVQNVLSAIFRGRGA	
EgGPAT (AAF64066)	(387) RTISFHGAGLSVTERINYGDIATHTQADEGRELFWNTLYNSVNVQNVLSAIFRGRGA	
AtGPAT (BAA00575)	(386) RLVCFHGAGLSVTERINYGDIATHTQADEGRELFWNTLYNSVNVQNVLSAIFRGRGA	
PoGPAT (CAA41769)	(384) RTISFHGAGLSVTERINYGDIATHTQADEGRELFWNTLYNSVNVQNVLSAIFRGRGA	
PvGPAT (CAA56159)	(388) RTISFHGAGLSVTERINYGDIATHTQADEGRELFWNTLYNSVNVQNVLSAIFRGRGA	
OsLPAT (ABB47826)	(289) GILNHSVVKLLIINHPTEGNDALCS---EARKVIADTLILNGYGVH-----	
ZmLPAT (PC0519737)	(291) GILNHSVVKLLIINHPTEGNDALCS---EARNVIADTLILNGYGVH-----	
AtLLPAT (Q8GXU8)	(319) GILNHSVVKLLIINHPTEGNDALCS---EARKVIADTLILNGYGVH-----	
BnLPAT (Q9LLY4)	(305) GILNHSVVKLLIINHPTEGNDALCS---EARNVIADTLILNGYGVH-----	
CnLPAT (Q42670)	(256) TVKYFSPDKTDDEEEKINHYVEMIALYVDHLPESQKPLVSKGRDASGRSNS-----	
SpDGAT2 (AAQ89590)	(270) DVVVGKPMVEKQMPNPSAEVVAELHAQFLANVETLFERYRESTGNAGAEIRLIL-----	
OsDGAT2-1 (XP_467452)	(286) HVVVGKPIEVKNKQPTFDEINEVHEQFTVALQDLFEKYKTGAGYFNILHLRVL-----	
ZmDGAT2-2 (PC0521364)	(280) HVVVGKPIEVKNKQPTFDEINEVHEQFTVALQDLFEKYKTGAGYFNILHLRVL-----	
AtDGAT2 (NP_566952)	(263) HVVVGKPIEVKNKQPTFDEINEVHEQFTVALQDLFEKYKTGAGYFNILHLRVL-----	
OsDGAT2-2 (BAD33251)	(288) HVVVGKPIEVKNKQPTFDEINEVHEQFTVALQDLFEKYKTGAGYFNILHLRVL-----	
ZmDGAT2-1 (PC0521362)	(281) HVVVGKPIEVKNKQPTFDEINEVHEQFTVALQDLFEKYKTGAGYFNILHLRVL-----	
	16	17
ZmDGAT1-2 (ASK)	(472) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
ZmDGAT1-2 (EF09B)	(472) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
ZmDGAT1-2 (Mo17)	(472) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
ZmDGAT1-2 (B73)	(472) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
OsDGAT1-2 (BAD53762)	(454) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
TaDGAT1-2 (wrl.pk0119.b6)	(486) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
ZmDGAT1-1	(491) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
OsDGAT1 (AAV59457)	(483) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
OsDGAT1-1 (rls24.pk0034.d8)	(479) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
GmDGAT (sr1.pk0098.a8)	(483) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
GmDGAT1 (AA978622)	(477) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
LcDGAT1 (AAW51456)	(488) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
OsDGAT1 (AAS01606)	(511) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
PDGAT1 (AAG23696)	(513) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
NcDGAT (AAF19345)	(511) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
BjDGAT1 (AAY40784)	(482) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
BjDGAT1 (AAY40785)	(482) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
AtDGAT1 (CAB45373)	(499) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
RcDGAT1 (AAR11479)	(502) YGQPCVLLYYHVMNR-QAQSR-	
ZmGPAT (p0036.cmtan26)	(224) AVENMVISLSQFWR-----	
OsGPAT (Q7XBU3)	(414) DSSDSAISLSQFWR-----	
EgGPAT (AAF64066)	(447) NASMSIISLSQFWR-----	
AtGPAT (BAA00575)	(446) EASTSRVLSQFWR-----	
PoGPAT (CAA41769)	(444) QASTPVVLSQFWR-----	
PvGPAT (CAA56159)	(448) EASTPVVLSQFWR-----	
OsLPAT (ABB47826)	(333) -----	
ZmLPAT (PC0519737)	(335) -----	
AtLLPAT (Q8GXU8)	(357) -----	
BnLPAT (Q9LLY4)	(345) -----	
CnLPAT (Q42670)	(309) -----	
SpDGAT2 (AAQ89590)	(323) -----	
OsDGAT2-1 (XP_467452)	(339) -----	
ZmDGAT2-2 (PC0521364)	(333) -----	
AtDGAT2 (NP_566952)	(315) -----	
OsDGAT2-2 (BAD33251)	(341) -----	
ZmDGAT2-1 (PC0521362)	(334) -----	
	18	

FIGURA 33E

> Proteína ZmAAP1 e 10 melhores alinhamentos

ZmAAP1 (Mo17)	(1)	-----MDVDMQARGGGGSHGGELDD	KEKSTGTVW	AS
ZmAAP2	(1)	-----MVGAMRGGAMELEDRLATEPRFRGDHDD	KEKSTGTVW	AT
OsAAP (BAD53557)	(1)	-----MDVYLPRTOGDVDD	KEKSTGTVW	AT
OsAAP (BAD53554)	(1)	MAKDVEMAVRNGDGGGGGGYYATHPHGGAGGEDVD	KKORSTGNVW	AS
OsAAP (BAD37473)	(1)	--MASVDLELGRPLSAAAAAYPPPLRRSINDDDVD	KKPKSTTEW	AS
RcAAP (CAA07563)	(1)	---MVENTAAKNHPHQVFDVSINMQTVVGSKWLDD	TKSTGTVW	AS
AtAAP (AAM91305)	(1)	-----MVQNHQTVLAVDMPOTGGSKYLLDD	KNKSTGVW	AS
AtAAP1 (BAB83868)	(1)	-----MKSFNTEGHNHSTAESGDAYTVSDPTKNVDD	REKSTGTWL	AS
BnAAP (CAD92449)	(1)	-----MKSFNTDQHGHSAAESGDVYAMSPTKNVDD	REKSTGTWL	AS
AtAAP6 (BAA97227)	(1)	-----MEKKKSMFVEQSFPEHEIGDTNKNFDD	RDKSTTWM	GS
ZmAAP1 (Mo17)	(35)	ARIITAVIGSGVLSLAAMQICVACFVILLILAAIYY	SGLTDCYR	
ZmAAP2	(43)	ARIITAVIGSGVLSLAAMQICVACFPTLLVLAAIYY	CGLIADCYR	
OsAAP (BAD53557)	(29)	ARIITAVIGSGVLSLAAMQICVACFPTLLLLAAIYY	CGLISDCYR	
OsAAP (BAD53554)	(51)	ARIITAVIGSGVLSLAATAQICVACFPTLLMLALIYY	SGLIADCYR	
OsAAP (BAD37473)	(49)	ARIITAVIGSGVLSLAATAQICVACFPTLLVVAVIYY	SVLIADCYR	
RcAAP (CAA07563)	(48)	ARIITAVIGSGVLSLAATAQICVACFPAVMFLSLVYY	STLSACYR	
AtAAP (AAM91305)	(39)	ARIITAVIGSGVLSLAATAQICVACFPVVMLLSAVTYF	SSLAACYR	
AtAAP1 (BAB83868)	(46)	ARIITAVIGSGVLSLAATAQICVACFIACTSELLISFIYY	STMLADCYR	
BnAAP (CAD92449)	(46)	ARIITAVIGSGVLSLAATAQICVACFIACTELLILISFIYY	STMLADCYR	
AtAAP6 (BAA97227)	(42)	ARIITAVIGSGVLSLAATAQICVACFPAVLMAISFIYY	STMLADCYR	
ZmAAP1 (Mo17)	(85)	FG-PATCKSNFYTEAESYICGRYWFCCGFCQV	MFPTGIIYTTITAS	
ZmAAP2	(93)	VG-PPVTCKSNFYTEAKSNIGCWYWFCCGFCQV	MFPTGIIYTTITAS	
OsAAP (BAD53557)	(79)	VG-PPATCKSNFYTDARSYICGWHWFCCGFCQV	MFPTGIIYTTITAS	
OsAAP (BAD53554)	(101)	TG-PPVSCPNFYTMDAAYICGQWWSGCVFQV	LVTAIGYTTITAS	
OsAAP (BAD37473)	(99)	AGGQVSGPNFYTMDAESYICGRQWFCCGFCQV	LVTAIGYTTITAS	
RcAAP (CAA07563)	(98)	SG-PPVNGPNFYTMDAVRNIGCAKKLGEVQYL	LFVAIGYTTASS	
AtAAP (AAM91305)	(89)	SG-PPISCPNFYTMDA-RSNIGVKTLCIVQYL	LFVAIGYTTASA	
AtAAP1 (BAB83868)	(96)	AP-PPVTCKSNFYTMVRSYICGRKQLCVA	IGLIVTVYTTITAS	
BnAAP (CAD92449)	(96)	AP-PPITCKSNFYTMVRSYICGRKQLCVA	IGLIVTVYTTITAS	
AtAAP6 (BAA97227)	(92)	SP-PPVTCKSNFYMEVRSYICGRKQLCVA	IGLIVTVYTTITAS	
ZmAAP1 (Mo17)	(134)	ASAAILKSNCFHWHCHDADTQNTGSYIVGGGVVQV	IFSQISNFHELWW	
ZmAAP2	(142)	ISAAINKSNCFHWHCHDADSONTSAYIIGGGVVQV	IFSQIHNFHKLWW	
OsAAP (BAD53557)	(128)	ISAAINKSNCFHWRCHGTDSONTSAYIIGGGVLQAL	FCQIPNFHQWLWW	
OsAAP (BAD53554)	(150)	ISAAVHKANCFYKKNCHDADGVYDTYTMIVFGVVQV	IFFSMPNFSDLWS	
OsAAP (BAD37473)	(149)	ISAAVYKSNCFYKKNCHSADSVFTTSYMVVFGVVQV	FFSQISLHEVAV	
RcAAP (CAA07563)	(147)	IMMIIKSNCFYKSGKNPHINANPYMIAGLAEIIFSQ	IPDFDQLWW	
AtAAP (AAM91305)	(138)	IMMIIKSNCFYKSGKDPHMNINPYMIAGLIVQIIFSQ	IPDFDQLWW	
AtAAP1 (BAB83868)	(145)	ISLVVVGKSNCFYDKCHTADTISNYPYMAVGLIQVIL	ISQIPNFHKLSE	
BnAAP (CAD92449)	(145)	ISLVVIGKANFYKKNCHHADTISNYPYMAVGLIQVIL	ISQIPNFHKLSE	
AtAAP6 (BAA97227)	(141)	ISMVVKSNCFYKKNCHNVKATSNTPEMIIFALIQVIL	ISQIPNFHNLWS	

FIGURA 34A

ZmAAP1 (Mo17)	(184)	LSVLAAVSSSTIAVGSLAQITISG-PTGKTTLYTQVVDVGSAAE
ZmAAP2	(192)	LSILAVSSSTIAVGSLAQIVMG-PTGKTTMTTLVVDVDAAG
OsAAP (BAD53557)	(178)	LSILAVSSSTIAVGSLAQITMD-PLGRTTLYTVVVDVDAAG
OsAAP (BAD53554)	(200)	LSILAVSSSTIAVGSLAQITISG-ATGKTTLYVEVVDVDAAG
OsAAP (BAD37473)	(199)	LSVLAVSSSTIAVGSLAQITISG-PTGMTTMSSTVVDVDAAG
RcAAP (CAA07563)	(197)	LSILAVSSSTIAVGSLAQIVMG-PTGKTTMTTLVVDVDAAG
AtAAP (AAM91305)	(188)	LSILAVSSSTIAVGSLAQIVMG-PTGKTTMTTLVVDVDAAG
AtAAP1 (BAB83868)	(195)	LSILAVSSSTIAVGSLAQIVMG-PTGKTTMTTLVVDVDAAG
BnAAP (CAD92449)	(195)	LSILAVSSSTIAVGSLAQIVMG-PTGKTTMTTLVVDVDAAG
AtAAP6 (BAA97227)	(191)	LSILAVSSSTIAVGSLAQIVMG-PTGKTTMTTLVVDVDAAG
ZmAAP1 (Mo17)	(233)	ISLTFALNINFAISSTIVLIEIQTILRSP--A-NKTKKATLLGVSTT
ZmAAP2	(240)	ISLTFALNINFAISSTIVLIEIQTILRSP--A-NKTKKATLLGVSTT
OsAAP (BAD53557)	(226)	ISLTFALNINFAISSTIVLIEIQTILRSP--P-NATKRRATAAGISTT
OsAAP (BAD53554)	(248)	ISLTFALNINFAISSTIVLIEIQTILRSP--A-NKTKKATLLGVSTT
OsAAP (BAD37473)	(247)	ISLTFALNINFAISSTIVLIEIQTILRSP--A-NKTKKATLLGVSTT
RcAAP (CAA07563)	(245)	ISLTFALNINFAISSTIVLIEIQTILRSP--S-NKTKKATLLGVSTT
AtAAP (AAM91305)	(235)	ISLTFALNINFAISSTIVLIEIQTILRSP--S-NKTKKATLLGVSTT
AtAAP1 (BAB83868)	(243)	ISLTFALNINFAISSTIVLIEIQTILRSP--A-NKTKKATLLGVSTT
BnAAP (CAD92449)	(243)	ISLTFALNINFAISSTIVLIEIQTILRSP--A-NKTKKATLLGVSTT
AtAAP6 (BAA97227)	(240)	ISLTFALNINFAISSTIVLIEIQTILRSP--A-NKTKKATLLGVSTT
ZmAAP1 (Mo17)	(282)	GFMLCCCLGSAFNAAPNITGFFIYEFYVDFNACIVVVLVGA
ZmAAP2	(289)	GFMLCCCLGSAFNAAPNITGFFIYEFYVDFNACIVVVLVGA
OsAAP (BAD53557)	(275)	GFMLCCCLGSAFNAAPNITGFFIYEFYVDFNACIVVVLVGA
OsAAP (BAD53554)	(297)	GFMLCCCLGSAFNAAPNITGFFIYEFYVDFNACIVVVLVGA
OsAAP (BAD37473)	(296)	GFMLCCCLGSAFNAAPNITGFFIYEFYVDFNACIVVVLVGA
RcAAP (CAA07563)	(294)	GFMLCCCLGSAFNAAPNITGFFIYEFYVDFNACIVVVLVGA
AtAAP (AAM91305)	(284)	GFMLCCCLGSAFNAAPNITGFFIYEFYVDFNACIVVVLVGA
AtAAP1 (BAB83868)	(292)	GFMLCCCLGSAFNAAPNITGFFIYEFYVDFNACIVVVLVGA
BnAAP (CAD92449)	(292)	GFMLCCCLGSAFNAAPNITGFFIYEFYVDFNACIVVVLVGA
AtAAP6 (BAA97227)	(290)	GFMLCCCLGSAFNAAPNITGFFIYEFYVDFNACIVVVLVGA
ZmAAP1 (Mo17)	(330)	YQYFCQELAAVEADVAARWACSARER-----RGGVDVFLV
ZmAAP2	(339)	YQYFCQELAAVEGAVAARYGSTREYG-----AAGENVFLV
OsAAP (BAD53557)	(325)	YQYFCQELAAVEGGVAARCGLLGGGAG-----RAGENVFLV
OsAAP (BAD53554)	(347)	YQYFCQELAAVEITFAARRWGSEFITRERPV--VAGSFSYNMFLV
OsAAP (BAD37473)	(346)	YQYFCQELAAVEITFAARRWGSEFITRERPV--VAGSFSYNMFLV
RcAAP (CAA07563)	(344)	YQYFCQELAAVEITFAARRWGSEFITRERPV--VAGSFSYNMFLV
AtAAP (AAM91305)	(334)	YQYFCQELAAVEITFAARRWGSEFITRERPV--VAGSFSYNMFLV
AtAAP1 (BAB83868)	(342)	YQYFCQELAAVEITFAARRWGSEFITRERPV--VAGSFSYNMFLV
BnAAP (CAD92449)	(342)	YQYFCQELAAVEITFAARRWGSEFITRERPV--VAGSFSYNMFLV
AtAAP6 (BAA97227)	(340)	YQYFCQELAAVEITFAARRWGSEFITRERPV--VAGSFSYNMFLV

FIGURA 34B

ZmAAP1 (Mo17)	(370)	AFVALITLCVLLPFFNSIL IL SIGSPLFFVY YIQQQIPRF
ZmAAP2	(379)	AFVAVITLLAILMPPNSIL IL SIAVPLFFVY YIQHQVRRF
OsAAP (BAD53557)	(367)	AFVAVITLLAILMPPNSIL IL SIAVPLFFVY YIQHQLPRF
OsAAP (BAD53554)	(395)	AFVYSTVLAIVMPPNDIL FLAVGMPFFVY YIQHQIQRY
OsAAP (BAD37473)	(392)	AFVACTAVAAVPPNDVLL FLAVGMPFFVY YIRPKLERS
RcAAP (CAA07563)	(394)	LFVFTTVISMLLPPNDIV LLALGMPFFVY YIAQKKIPK
AtAAP (AAM91305)	(384)	VFVFTTVISMLLPPNDV LLALGMPFFVY YIAQKKIPK
AtAAP1 (BAB83868)	(392)	AFVITTVVAMIEFFMAIL LLGAASMPFFVY YIAQTKIKKY
BnAAP (CAD92449)	(392)	AFVITTVVAMIEFFMAIL LLGAASMPFFVY YIAQTKVKKY
AtAAP6 (BAA97227)	(390)	SYVVTAVVAMIEFFNDFL LLGAASMPFFVY YIAQKKIPK
ZmAAP1 (Mo17)	(420)	SATSLAQALSIF FVITVAAGAA VQCVRDSLKTYVPTRS-
ZmAAP2	(429)	STKSLAQSLSFV FLVTAASCAA VQCVDSLKTYVPTRS-
OsAAP (BAD53557)	(417)	SAKSLAQSLSLV FLVTAACAA IQCVDSLKTYVPTRS-
OsAAP (BAD53554)	(445)	TSRSLAQTLSSL CFVSLASAVA IECVSESLKHYVPTKS-
OsAAP (BAD37473)	(442)	SKRSLAQSLNAV FVVLASAVA VQIAESMAHYVPTKSL-
RcAAP (CAA07563)	(444)	SSTRSLCQILSAA LVITIAAAAG IACVVGDLKSVKPTQSY-
AtAAP (AAM91305)	(434)	SSTRSLCQVFSLG LVVSLAAAAG IACVLLDLKSYKPTSEY-
AtAAP1 (BAB83868)	(442)	SARSLAKTMCYV LVVSLAAAAG IACLISSVKTYKPTMHE
BnAAP (CAD92449)	(442)	SSTRSLGKMLCWV LVVSLAAAAG IACLISSVKTYKPTIHE
AtAAP6 (BAA97227)	(440)	SFTSLTWKILSWT FEVSLVAAAAG VQCLIQSLKDEKPTQAP--

FIGURA 34C

> Proteína ZmPESP e 10 melhores alinhamentos

```

ZmPESP (MO17)      (1) MSTRRRSNHPGCSFPLPFLVCGLLLAFAVAFSPAARAEAADGGAGHEGRA
OsPESP (BAD53823)  (1) MSTRRR--AGPLRLRLRLLVVVAFAAVAFCPAAAAAAGEGVGVVEEEE
AtPESP (NP_849990) (1) -MRRCKNNTDKFSVITMRLLTLLICTFFFFFSFAYSAESDN-----
AtPESP (NP_196741) (1) MVEGR--RRRFSLSQQALALLLLSFFLCFSVASPRAISDSLLDET
AtPESP (AAL49821)  (1) -----MARFAVIGLTFLLLGTSLS---ARSDEETRER--
AtPESP (BAB11240)  (1) -----MARFAVIGLTFLLLGTSLS---ARSDEETRER--
AtPESP (CAB87698)  (1) MVEGR--RRRFSLSQQALALLLLSFFLCFSVASPRAISDSLLDET
OsPESP (NP_912478) (1) -MAPAAAGRVPLSRRRSTAALLLVALALVLGVQLRSAAARPDKEKREK--
NsPESP (BAB73745)  (1) -----
NpPESP (ZP_00101985) (1) -----

ZmPESP (MO17)      (51) GKPEVEAAEARGDG----VAVAEAGGEVVAQGNATEAK-----E
OsPESP (BAD53823)  (49) VRVGEAAAAVARGEDDAVVAAAVAGGEVAGEAGAGLGEGAAAANATGKE
AtPESP (NP_849990) (42) -----ETDS-----VVTREINGTVVESNATSAPK-----RE
AtPESP (NP_196741) (49) AN-----SSSSVASLNASSSSSLVKP-----KE
AtPESP (AAL49821)  (31) -----FYGNVNSTAP-GNG-----E
AtPESP (BAB11240)  (31) -----FYGNVNSTAP-GNG-----E
AtPESP (CAB87698)  (49) AN-----SSSSVASLNASSSSSLVKP-----KE
OsPESP (NP_912478) (48) -----FYGKVTNGSGNATG-----D
NsPESP (BAB73745)  (1) -----
NpPESP (ZP_00101985) (1) -----

ZmPESP (MO17)      (87) GSTADMIDRALEKEFPESGEQGGGETDPGSFNNITVAEKQICNANCSSCS
OsPESP (BAD53823)  (99) GSTADMIDRALEKEFPESGEQGGGEKDPGSFNNITVAEK-----
AtPESP (NP_849990) (68) DSFADMIDRALEKEFPDNDQNEVP---DPGSFNNISVADQ-----
AtPESP (NP_196741) (72) GSFADMIDRALEKEFNESDQNEVA---DPGSFNNISVAG-----
AtPESP (AAL49821)  (46) GSTAKMFDRLVLEKEFSENDSPEGS---DGASFNSSVADQ-----
AtPESP (BAB11240)  (46) GSTAKMFDRLVLEKEFSENDSPEGS---DGASFNSSVADQ-----
AtPESP (CAB87698) (72) GSFADMIDRALEKEFNESDQNEVA---DPGSFNNISVAGQFEYLNVRLLV
OsPESP (NP_912478) (64) GSTAKMFGRLVLEKEFSDDTPEAP---DKSSFNNISIDH-----
NsPESP (BAB73745)  (1) -----
NpPESP (ZP_00101985) (1) -----

ZmPESP (MO17)      (137) F-YSYQGVLETVARRV-TK--KNETKDNK-----SFPFKEVFLDR
OsPESP (BAD53823)  (138) -----QGVLETVARRV-TK--KNETKDNK-----SFPFKEVFLDR
AtPESP (NP_849990) (104) -----QAVLETVARVK-PK--KNETKTKE-----EKSFFNLDNEN
AtPESP (NP_196741) (107) -----QAVLETVARVKSTK--KNETKEEK-----RFQIHDVFNLN
AtPESP (AAL49821)  (82) -----QAELETVAIVTHEKGKNDTQENNGTR-----PFQIQDVFSLE
AtPESP (BAB11240)  (82) -----QAELETVAIVTHEKGKNDTQENNGTR-----PFQIQDVFSLE
AtPESP (CAB87698) (119) VPCGDQAVLETVARVKSTK--KNETKEEKRIKRYLIFHRRFQIHDVFNLN
OsPESP (NP_912478) (100) -----QAVLETVAIVTHDK-KKNDSEQANSSK-----PFQIQDMFGGQ
NsPESP (BAB73745)  (1) -----
NpPESP (ZP_00101985) (1) -----

ZmPESP (MO17)      (173) TE--QEDVPTLIDR-----K-----LDLP--SDLVVIVS
OsPESP (BAD53823)  (170) PE--QEDVPTLIDRKDNVFIISNPK---SKYPVLQLDLR--SDLVVIVS
AtPESP (NP_849990) (136) G---VEDTPLRIDRKDNVFIISNPK---SKYPVLQLDLR--SDLVVIVS
AtPESP (NP_196741) (141) NDNRAEDTPTLIDRKDNVFIISNPK---SKYPVLQLDLR--SDLVVIVS
AtPESP (AAL49821)  (120) NED--SDMT-LIDKKNVFMVSNKK---SKYPVLQLDLR--SDLVVIVF
AtPESP (BAB11240)  (120) NED--SDMT-LIDKKNVFMVSNKK---SKYPVLQLDLR--SDLVVIVF
AtPESP (CAB87698) (167) NDNRAEDTPTLIDRKVSFYTGRLSLDLLHYFLHGSFGLV--SDLVVIVS
OsPESP (NP_912478) (137) NEN--SDLETVIDRKDNVFMVSNRK---TKYPTLQLDLR--SDLVVIVS
NsPESP (BAB73745)  (1) -----MQEDFR--VVL--SVLAV
NpPESP (ZP_00101985) (1) -----MQEDFR--VVL--LVIGV

```

FIGURA 35A

ZmPESP (MO17)	(201)	TCCIAFACLAGVVKITGGLASSIICPGFSFVSMVQVAVQF
OsPESP (BAD53823)	(215)	TFIAFACLAG--ITGGLASSIICPGFSFVSMVQVAVQF
AtPESP (NP_849990)	(180)	TCCIAFACAGP---ITGGLASSIICPGLSFVSMVQVAVQF
AtPESP (NP_196741)	(188)	TCCIAFACAGT---ITGGLASSIICPGLNFIISMVQVAVQF
AtPESP (AAL49821)	(165)	AIGIVFSCLAG--IVGGLASSIICPGLKFIISMVQVAVQF
AtPESP (BAB11240)	(165)	AIGIVFSCLAGP---IVGGLASSIICPGLKFIISMVQVAVQF
AtPESP (CAB87698)	(217)	TCCIAFACAGT---ITGGLASSIICPGLNFIISMVQVAVQF
OsPESP (NP_912478)	(183)	TAGGIIFSCLAG--IVGGLASSIICPGLNFIISMVQVAVQF
NsPESP (BAB73745)	(18)	ACGLFAALLKQ---LLGVIIGMVQFAVLGLIKVIVQVTLAQF
NpPESP (ZP_00101985)	(18)	ACGLLAALLRQ---LLGVIIGMIVFASLGLIKVIVQVTLAQF
ZmPESP (MO17)	(251)	IFLLFALGLEETAKRVVRAVAVIGLLQIILFMFLCGITATL---CGG
OsPESP (BAD53823)	(263)	IFLLFALGLEETAKRVVRAVAVIGLLQIILFMFLCGISATL---CGG
AtPESP (NP_849990)	(228)	IFLLFALGLEETAAKRVVRAVAVIGLLQIILFMFLCGITATL---CGG
AtPESP (NP_196741)	(236)	VLLFALGLEETAKRVVRSVAVIGLLQIILFMFLCGITVSL---CGG
AtPESP (AAL49821)	(213)	VLLFALGLEETMTKRVVGPVAVIGLLQIILFMFLCGVTALL---CGA
AtPESP (BAB11240)	(213)	VLLFALGLEETMTKRVVGPVAVIGLLQIILFMFLCGVTALL---CGA
AtPESP (CAB87698)	(265)	VLLFALGLEETAK-----CGG
OsPESP (NP_912478)	(231)	VLLFALGLEETLTKRVVGPVAVIGLLQIILFMFLCGITAAAL---CGA
NsPESP (BAB73745)	(66)	AILLALVVERFAEKVKVKAIALGGGGLQIALTLTTLTVLCGLTGAWA
NpPESP (ZP_00101985)	(66)	AILLALVVERFAEKVKVKAIALGGGGLQIALTLTTLTVVVGSLSGAWT
ZmPESP (MO17)	(298)	KTKGVVGVLLGMSSTAVLFLFMERNISALHGVTVITLILDCAVG
OsPESP (BAD53823)	(310)	KTKGVVGVLLGMSSTAVLFLFMERNISALHGVTVITLILDCAVG
AtPESP (NP_849990)	(275)	KLTEITVGAFLMSSTAVLFLFMERNISALHGVTITLILDCAVG
AtPESP (NP_196741)	(283)	KRSEVTVGAFLMSSTAVLFLFMKNSTNELHGVTIGILILDCAVG
AtPESP (AAL49821)	(260)	RLSEGITVGAFLGMSSTAVVFLFMERNSTSSLHGVTIGILIFDCVVG
AtPESP (BAB11240)	(260)	RLSEGITVGAFLMSSTAVVFLFMERNSTSSLHGVTIGILIFDCVVG
AtPESP (CAB87698)	(284)	KRSEVTVGAFLMSSTAVLFLFMKNSTNELHGVTIGILILDCAVG
OsPESP (NP_912478)	(278)	KSGSEVTVGAFLMSSTAVSFLFMKNSTNALHGVTITLILAACTII
NsPESP (BAB73745)	(116)	LPKAVTLGSLILGCTAVLCLCMERNETETPHGVMLIIVVLDLALG
NpPESP (ZP_00101985)	(116)	LPKAVTLGSLILGCTAVLCLCMERNETETPHGVMLIGIIVVLDLALG
ZmPESP (MO17)	(348)	LLFALLPILSGTSGLLHGVSMMKS---LVLITFTLILSILSRGVPWF
OsPESP (BAD53823)	(360)	LLFALLPILSGASGLLQGVSMKS---LVLITFTLILSILSRGVPWF
AtPESP (NP_849990)	(325)	LLFALLPVLGTSGLVGLQVSMKS---LAILIAFLGALFVLSREWVPWF
AtPESP (NP_196741)	(333)	LLFALLPVLEGNSGIVHGMISIGK---VVLILLSFLAVSILSRGCPWL
AtPESP (AAL49821)	(310)	LLFALLPVLGGNSGLLQGIISMCKL---LLILSTYLTVASLITWSFVPRF
AtPESP (BAB11240)	(310)	LLFALLPVLGGNSGLLQGIISMCKL---LLILSTYLTVASLITWSFVPRF
AtPESP (CAB87698)	(334)	LLFALLPVLEGNSGIVHGMISIGKGGGFVAVVFGCFVNIITDMYSILVAEAN
OsPESP (NP_912478)	(328)	RYN-----CCYDDLVICSSILETDDS
NsPESP (BAB73745)	(166)	LMIAVLPALHE----PGEVIVAVLTALVRIGLFAAGAVAAGIIVTPPL
NpPESP (ZP_00101985)	(166)	LMIAVLPALNQ----PAETIGIAVLTALLWIALFAAGAVAAGMWLTPPL
ZmPESP (MO17)	(395)	LKLMISLSSQTNELYQLAAVAFCLLFAWVSFYCSYIDFDLAYGPIFLYFI
OsPESP (BAD53823)	(407)	LKLMISLSSQTNELYQLAAVAFCLLFAW-----
AtPESP (NP_849990)	(372)	LKLMISLSSQTNELYQLAAVAFCLLVAW-----
AtPESP (NP_196741)	(380)	LKLMISLSSQTNELYQLAAVAFCLLVAW-----
AtPESP (AAL49821)	(357)	LKLMISLSSQTNELYQLAAVAFCLLSAW-----
AtPESP (BAB11240)	(357)	LKLMISLSSQTNELYQLAAVAFCLLSAW-----
AtPESP (CAB87698)	(384)	GGLIVTDSHMCVPSLIWSWCVFGNSSDK-----
OsPESP (NP_912478)	(351)	ATIAVRSQYHTNELYQLAGVAFCLLVAW-----
NsPESP (BAB73745)	(211)	LELARTESR--ELELLGVALCLGIAL-----
NpPESP (ZP_00101985)	(211)	LELARTESR--ELELLGVALCLGIAL-----

FIGURA 35B

ZmPESP (MO17)	(445)	IKTVFVKDLKCSDKLGLSLGLSSFAAGVMIETTDLQH	EQEPIRNFF
OsPESP (BAD53823)	(435)	-----CSDKLGLSLGLSSFAAGVMIETTDLQH	EQEPIRNFF
AtPESP (NP_849990)	(400)	-----CSDKLGLSLGLSSFAAGVMIETTDLQH	EQEPIRNFF
AtPESP (NP_196741)	(408)	-----CSDKLGLSLGLSSFAAGVMIETTDLQH	EQEPIRNFF
AtPESP (AAL49821)	(385)	-----CSDKLGLSLGLSSFAAGVMIETTDLQH	EQEPIRNFF
AtPESP (BAB11240)	(385)	-----CSDKLGLSLGLSSFAAGVMIETTDLQH	EQEPIRNFF
AtPESP (CAB87698)	(412)	-----CSDKLGLSLGLSSFAAGVMIETTDLQH	EQEPIRNFF
OsPESP (NP_912478)	(379)	-----CSDYLGLSLGLSSFAAGVMIETTDLQH	EQEPIRNFF
NsPESP (BAB73745)	(237)	-----LTESLGLSLGLSSFAAGVMIETTDLQH	EQEPIRNFF
NpPESP (ZP_00101985)	(237)	-----LTESLGLSLGLSSFAAGVMIETTDLQH	EQEPIRNFF
ZmPESP (MO17)	(495)	AALFLASGLINVTINVHFWNHVDILAAIIVITVTFIVAVV	KGFGSN
OsPESP (BAD53823)	(475)	AALFLASGLINVTINVHFWNHVDILAAIIVITVTFIVAVV	KGFGSN
AtPESP (NP_849990)	(440)	AALFLASGLINVTINVHFWNHVDILAAIIVITVTFIVAVV	KGFGSN
AtPESP (NP_196741)	(448)	AALFLASGLINVTINVHFWNHVDILAAIIVITVTFIVAVV	KGFGSN
AtPESP (AAL49821)	(425)	AALFLASGLINVTINVHFWNHVDILAAIIVITVTFIVAVV	KGFGSN
AtPESP (BAB11240)	(425)	AALFLASGLINVTINVHFWNHVDILAAIIVITVTFIVAVV	KGFGSN
AtPESP (CAB87698)	(452)	AALFLASGLINVTINVHFWNHVDILAAIIVITVTFIVAVV	KGFGSN
OsPESP (NP_912478)	(419)	AALFLASGLINVTINVHFWNHVDILAAIIVITVTFIVAVV	KGFGSN
NsPESP (BAB73745)	(277)	ASLFFAAIGLIDPVGLQIELIIGLAFLGFLIITPL	KLRLPL
NpPESP (ZP_00101985)	(277)	ASLFFAAIGLIDPVGLQIELIIGLAFLGFLIITPL	KLRLPL
ZmPESP (MO17)	(545)	KTALLVGMSLAQIGEFVLLSRASSHLIEGKLYLL	LTALSVT
OsPESP (BAD53823)	(525)	KTALLVGMSLAQIGEFVLLSRASSHLIEGKLYLL	LTALSVT
AtPESP (NP_849990)	(490)	KTALLVGMSLAQIGEFVLLSRASSHLIEGKLYLL	LTALSVT
AtPESP (NP_196741)	(498)	KTALLVGMSLAQIGEFVLLSRASSHLIEGKLYLL	LTALSVT
AtPESP (AAL49821)	(475)	KTALLVGMSLAQIGEFVLLSRASSHLIEGKLYLL	LTALSVT
AtPESP (BAB11240)	(475)	KTALLVGMSLAQIGEFVLLSRASSHLIEGKLYLL	LTALSVT
AtPESP (CAB87698)	(502)	KTALLVGMSLAQIGEFVLLSRASSHLIEGKLYLL	LTALSVT
OsPESP (NP_912478)	(469)	KTALLVGMSLAQIGEFVLLSRASSHLIEGKLYLL	LTALSVT
NsPESP (BAB73745)	(327)	KTALLVGMSLAQIGEFVLLSRASSHLIEGKLYLL	LTALSVT
NpPESP (ZP_00101985)	(327)	KTALLVGMSLAQIGEFVLLSRASSHLIEGKLYLL	LTALSVT
ZmPESP (MO17)	(595)	LLFKMIAMVHLGVLLRFSPDS-----QVELGLKNDVLR	ISGK-
OsPESP (BAD53823)	(575)	LLFKMIAMVHLGVLLRFSPDS-----QVELGLKNDVLR	ISGK-
AtPESP (NP_849990)	(540)	LLFKMIAMVHLGVLLRFSPDS-----QVELGLKNDVLR	ISGK-
AtPESP (NP_196741)	(548)	LLFKMIAMVHLGVLLRFSPDS-----QVELGLKNDVLR	ISGK-
AtPESP (AAL49821)	(525)	LLFKMIAMVHLGVLLRFSPDS-----QVELGLKNDVLR	ISGK-
AtPESP (BAB11240)	(525)	LLFKMIAMVHLGVLLRFSPDS-----QVELGLKNDVLR	ISGK-
AtPESP (CAB87698)	(552)	LLFKMIAMVHLGVLLRFSPDS-----QVELGLKNDVLR	ISGK-
OsPESP (NP_912478)	(493)	LLFKMIAMVHLGVLLRFSPDS-----QVELGLKNDVLR	ISGK-
NsPESP (BAB73745)	(377)	FWLRVLAIVFNFAESIPMLKPYIAGEGQALDISDEPFQD	WVVCYGRV
NpPESP (ZP_00101985)	(377)	FWLRVLAIVFNFAESIPMLKPYIAGEGQALDISDEPFQD	WVVCYGRV
ZmPESP (MO17)	(636)	RINLVQGSNDS-----	
OsPESP (BAD53823)	(616)	RINLVQGSNDS-----	
AtPESP (NP_849990)	(580)	RINLVQGSNDS-----	
AtPESP (NP_196741)	(586)	RINLVQGSNDS-----	
AtPESP (AAL49821)	(561)	IEVHNRTK-----	
AtPESP (BAB11240)	(561)	IEVHNRTK-----	
AtPESP (CAB87698)	(590)	RINLVQGSNDS-----	
OsPESP (NP_912478)	(530)	LEAYNRS-----	
NsPESP (BAB73745)	(427)	GKNLVKLLQHNMPVVVIDQSESRIQQLRDAEIPYVYGNCVSLHVLETAG	
NpPESP (ZP_00101985)	(426)	GKNLVKLLQHNMPVVVIDQSESRIQQLRDAEIPYVYGNCVSLHVLETAG	

FIGURA 35C

ZmPESP (MO17)	(648)	-----
OsPESP (BAD53823)	(628)	-----
AtPESP (NP_849990)	(593)	-----
AtPESP (NP_196741)	(598)	-----
AtPESP (AAL49821)	(569)	-----
AtPESP (BAB11240)	(563)	-----
AtPESP (CAB87698)	(602)	-----
OsPESP (NP_912478)	(538)	-----
NsPESP (BAB73745)	(477)	VSHAKGMAIALPDPMSTRLCVKRALELCPELDLVVRATQDKNIELLYQLG
NpPESP (ZP_00101985)	(476)	VNHAKGMAIALPDPMSTRLCVKRALELRPELDLVVRATQDKNIEVLYQLG
ZmPESP (MO17)	(648)	-----
OsPESP (BAD53823)	(628)	-----
AtPESP (NP_849990)	(593)	-----
AtPESP (NP_196741)	(598)	-----
AtPESP (AAL49821)	(569)	-----
AtPESP (BAB11240)	(563)	-----
AtPESP (CAB87698)	(602)	-----
OsPESP (NP_912478)	(538)	-----
NsPESP (BAB73745)	(527)	AREVVQPEFEASIEATHLLTDVGWTS-GLLQEQMQIRSDHYLDFRPER
NpPESP (ZP_00101985)	(526)	AREVVQPEFEASLEMATYLLTGLGLLSSAVVQREMQQIRNDHYLDLFRPER
ZmPESP (MO17)	(648)	-----
OsPESP (BAD53823)	(628)	-----
AtPESP (NP_849990)	(593)	-----
AtPESP (NP_196741)	(598)	-----
AtPESP (AAL49821)	(569)	-----
AtPESP (BAB11240)	(563)	-----
AtPESP (CAB87698)	(602)	-----
OsPESP (NP_912478)	(538)	-----
NsPESP (BAB73745)	(576)	NADEVSRHIQQATQDLNRRWYALPADSPLIGMNLEEADMRYLTGVSIMAI
NpPESP (ZP_00101985)	(576)	SATEVARDLRQATRDNLNRWYPLPADSPLIGMSIEEADMRYLTGASIMAI
ZmPESP (MO17)	(648)	-----
OsPESP (BAD53823)	(628)	-----
AtPESP (NP_849990)	(593)	-----
AtPESP (NP_196741)	(598)	-----
AtPESP (AAL49821)	(569)	-----
AtPESP (BAB11240)	(563)	-----
AtPESP (CAB87698)	(602)	-----
OsPESP (NP_912478)	(538)	-----
NsPESP (BAB73745)	(626)	RRANGEEIDYPSNQTKLAAGDRLLIVGAKEELAALEEFAQGVGVPQNS
NpPESP (ZP_00101985)	(626)	RRANGDEIDYPNNQTKLEDGDRLLVVGADDEELAALEFAKGQAAPGENS
ZmPESP (MO17)	(648)	-----
OsPESP (BAD53823)	(628)	-----
AtPESP (NP_849990)	(593)	-----
AtPESP (NP_196741)	(598)	-----
AtPESP (AAL49821)	(569)	-----
AtPESP (BAB11240)	(563)	-----
AtPESP (CAB87698)	(602)	-----
OsPESP (NP_912478)	(538)	-----
NsPESP (BAB73745)	(676)	ACQWVAVDANS AVLGKTLKDLALDIQSGIKVQAIIRRDGKFIRSPNDNIDL
NpPESP (ZP_00101985)	(676)	ACQWVTVNADTPTLGKTLADLDINKQFGVQVQAIIRRDGKFIRYPDGGMDL

FIGURA 35D

ZmPESP (MO17)	(648)	-----
OsPESP (BAD53823)	(628)	-----
AtPESP (NP_849990)	(593)	-----
AtPESP (NP_196741)	(598)	-----
AtPESP (AAL49821)	(569)	-----
AtPESP (BAB11240)	(563)	-----
AtPESP (CAB87698)	(602)	-----
OsPESP (NP_912478)	(538)	-----
NsPESP (BAB73745)	(726)	RTGDQVLLCGSLPSLNQIQPLFAVVNEIPLAIPIVKAKETE VVKEMRG--
NpPESP (ZP_00101985)	(726)	RVGDQVLLCGSLTGLSQIEQLFAIASSLPLSLPVLKAVQAEALKEFLPAD
ZmPESP (MO17)	(648)	---
OsPESP (BAD53823)	(628)	---
AtPESP (NP_849990)	(593)	---
AtPESP (NP_196741)	(598)	---
AtPESP (AAL49821)	(569)	---
AtPESP (BAB11240)	(563)	---
AtPESP (CAB87698)	(602)	---
OsPESP (NP_912478)	(538)	---
NsPESP (BAB73745)	(774)	---
NpPESP (ZP_00101985)	(776)	SVD

FIGURA 35E

> Proteína ZmS24 e 10 melhores alinhamentos

```

ZmS24 (Mo17)      (1) MADSKAAA TERTRKFMTHLLSPTGFLEVIIFGRPNSSAELKERL
ZmS24 (AAG23693) (1) MADSKATS TTSALGKFMTNRLIAPGCFLEVIIFGRANSSAELKERL
Oss24 (BAD53549) (1) MSESKAAA TERTRKFMTHLLSPTGFLEVLIFGRANSSADLKEKL
Oss24 (NP_916712) (1) MSDSKAAA TERTRKFMTHLLSPTGFLEVIIFGRPNSSAELKEKL
Oss24 (XP_464768) (1) MADTKTAP TERTRKFMTHLLSPTGFLEVLIFGRANSSADLKEKL
Ats19 (AAM16200) (1) ----MAEK TERTRKFMTHLLSPTGFIDVLIFGRANSSAELKEKL
Ats19 (AAM63791) (1) ----MAEK TERTRNFMTHLLARKGFIDVLIFGRANSSAELKEKL
Ats19 (AAL66893) (1) ----MAEK TERTRNFMTHLLARKGFIDVLIFGRANSSAELKEKL
AmS24 (XP_623734) (1) ----MTEG TERTRKFMTHLLCKGMAVDVFHCHGPSRRTETREKL
Dds24 (AAS38787) (1) ----MDKA VVRTRKVLTHLLSPTGFVEVVEGRKANSSKDLKTTI

ZmS24 (Mo17)      (51) KLYE KDPNCIFVKKRTHFGGKSTFGLIYNLEAKKFEPRKRIIN
ZmS24 (AAG23693) (51) KMYE KDPNTIFVKKRTHFGGKSTFGLIYNLESKKFEPRKRIIN
Oss24 (BAD53549) (51) KLYE KDSNCIFVKKRTHFGGKSTFGLIYNLDAKKFEPRKRIIN
Oss24 (NP_916712) (51) KLYE KDANCIFVKKRTHFGGKSTFGLIYNLDAKKFEPRKRIIN
Oss24 (XP_464768) (51) KLYE KDSNCIFVKKRTHFGGKSTFGLIYNLDAKKFEPRKRIIN
Ats19 (AAM16200) (47) RMYE KDPNAIFVKKRTHFGGKSTFGLIYDTVESANFEPRKRIIN
Ats19 (AAM63791) (47) RMYE KDPNAIFCCKRTHFGGKSTFGLIYDTVENANFEPRKRIIN
Ats19 (AAL66893) (47) RMYE KDPNAIFCCKRTHFGGKSTFGLIYDTVENANFEPRKRIIN
AmS24 (XP_623734) (47) KMYKT-PDVVFVGGQTHFGGKSTFGLIYDTLDFAKFEPRKRIIN
Dds24 (AAS38787) (47) KLHK ADPETIFLGKTHFGGKSTFGLIYNLEIAKKFEPRKRIIN

ZmS24 (Mo17)      (101) SEATVEKSRNOMTERNNAKIRGVKKTAGDAKKK--
ZmS24 (AAG23693) (101) SEATVEKSRNOMTERNNAKIRGVKKTAGDAKKK--
Oss24 (BAD53549) (101) SEATVEKSRNOMTERNNAKIRGVKKTAGDAGKKK--
Oss24 (NP_916712) (101) SEATVEKSRNOMTERNNAKIRGVKKTAGDAGKKK--
Oss24 (XP_464768) (101) SEATVEKSRNOMTERNNAKIRGVKKTAGDAGKKK--
Ats19 (AAM16200) (97) SEDTIEKSRNOMTERNNAKIRGVKKTAGDAKKK--
Ats19 (AAM63791) (97) SEDTIEKSRNOMTERNNAKIRGVKKTAGDAKKK--
Ats19 (AAL66893) (97) SEDTIEKSRNOMTERNNAKIRGVKKTAGDTKKK--
AmS24 (XP_623734) (96) SEFEKQQTENQRERNNMNVRGTKKSVGAASKKKV
Dds24 (AAS38787) (97) SEYTNPQTSNQRERNNMNVRGTKKSVGAASKKKV

```

FIGURA 36

> Proteína ZmABCT e 10 melhores alinhamentos (atualizado)

```

ZmABCT(parcial, Mol17)      (1) ---MESAMEKVWESGRRMSRSIGRGMGMGMETWGVDDAFVPOHGS-----
ZmABCT(Compósito)          (1) ---MESAMEKVWESGRRMSRSIGRGMGMGMETWGVDDAFVPOHGS-----
OsABCT(BAD53545)           (1) ---MESAMEKVWESGRRMSRSIGR--GMGMETWGVDDAFVPOHSGGGGGS
OsABCP(NP_916719)          (1) MADPQHVQEEAAGAEAVHAHAARHDAVYMEIISRSLSMPASPDVSAYF
AtABCT(AAD39329)           (1) -----MDYNPNLPPLGGGGVSMRRSISRSVSRASRNIE-----
AtABCT(DAA00875)           (1) -----MDYDPAHAMSRGG--SMROTISRSVSKASRNME-----
AtABCT(AAD39650)           (1) -----MDYDPAHAMSRGG--SMROTISRSVSKASRNME-----
AtABCT(BAB01273)           (1) -----MDYDPAHAMSRGG--SMROTISRSVSKASRNME-----
OsABCT(XP_464576)           (1) -----MDIVRMGSAAGGGGVRRPTASSWRGTSG-----R
SpABCT(CAA94437)           (1) -----MEIAGYRGGSLRGSLLGSLRRSVSAWRSPS-----T
OsABCT(CAD59574)           (1) -----MAAAPSSAGRRSMGWGSSISQSFRQAE-----A

ZmABCT(parcial, Mol17)      (39) ---RSRGGGGGGGDDDEALRPAALRRTYSVVTAILSTEAAGVDDDD
ZmABCT(Compósito)          (39) ---RSRGGGGGGGDDDEALRPAALRRTYSVVTAILSTEAAGVDDDD
OsABCT(BAD53545)           (42) R-GRRRSGRGGTADDDEALRPAALRRTYSVVTAILSTEAAGVDDDD
OsABCP(NP_916719)          (51) SGASRRRPSAADEVDDEALRPAALRRTYSVVTAILSTEAAGVDDDD
AtABCT(AAD39329)           (34) DIFSGSRRTQSVNDDEALRPAALRRTYSVVTAILSTEAAGVDDDD
AtABCT(DAA00875)           (32) DIFNLSRRTKSVNDEALRPAALRRTYSVVTAILSTEAAGVDDDD
AtABCT(AAD39650)           (32) DIFNLSRRTKSVNDEALRPAALRRTYSVVTAILSTEAAGVDDDD
AtABCT(BAB01273)           (21) NNHFSRRSGSTIDDDDEALRPAALRRTYSVVTAILSTEAAGVDDDD
OsABCT(XP_464576)           (30) SDAFGRSVREE---DDEALRPAALRRTYSVVTAILSTEAAGVDDDD
SpABCT(CAA94437)           (32) SDVFGRSSREE---DDEALRPAALRRTYSVVTAILSTEAAGVDDDD
OsABCT(CAD59574)           (29) DDPFGRASQGGHDDDEALRPAALRRTYSVVTAILSTEAAGVDDDD

ZmABCT(parcial, Mol17)      (86) DDKPRRPPPPQQQFKEVDVRKLGVGGRQEFIERVFRVAEEINQRFQKLE
ZmABCT(Compósito)          (86) DDKPRRPPPPQQQFKEVDVRKLGVGGRQEFIERVFRVAEEINQRFQKLE
OsABCT(BAD53545)           (91) AGAGK-----QQYKEVDVRKLGVGGRQEFIERVFRVAEEINQRFQKLE
OsABCP(NP_916719)          (101) GAVGRGR--RWYAHREVDVRLTLELAQRQAFVFRVFRVAEEINQRFQKLE
AtABCT(AAD39329)           (84) QLM-----SKEVDVTKLDGEGRQKFIDMVFRVAEEINQRFQKLE
AtABCT(DAA00875)           (82) QIL-----NKAVDVTKLDGEGRQKFIDMVFRVAEEINQRFQKLE
AtABCT(AAD39650)           (82) QIL-----NKAVDVTKLDGEGRQKFIDMVFRVAEEINQRFQKLE
AtABCT(BAB01273)           (63) -----EDLVDVTKLGVDGRQKFIDMVFRVAEEINQRFQKLE
OsABCT(XP_464576)           (75) IGGLGLQERRN-----LIERLVRTAEEINQRFQKLE
SpABCT(CAA94437)           (79) IQGLGFQERKN-----LIERLVRTAEEINQRFQKLE
OsABCT(CAD59574)           (79) DGGGAAAAAKDGRMELVDIQKLAAGNL--GRALIDRVFQDSERFRLR

ZmABCT(parcial, Mol17)      (136) NIDRVGELFVFRFERLTVEARCHVSPALTLTARNVAEALGL
ZmABCT(Compósito)          (136) NIDRVGELFVFRFERLTVEARCHVSPALTLTARNVAEALGL
OsABCT(BAD53545)           (135) NIDRVGELFVFRFERLTVEARCHVSPALTLTARNVAEALGL
OsABCP(NP_916719)          (149) AKIDRAGQMFVFRFERLTVEARCHVSPALTLTARNVAEALGL
AtABCT(AAD39329)           (124) NIDRVGELFVFRFERLTVEARCHVSPALTLTARNVAEALGL
AtABCT(DAA00875)           (122) NIDRVGELFVFRFERLTVEARCHVSPALTLTARNVAEALGL
AtABCT(AAD39650)           (122) NIDRVGELFVFRFERLTVEARCHVSPALTLTARNVAEALGL
AtABCT(BAB01273)           (100) NIDRVGELFVFRFERLTVEARCHVSPALTLTARNVAEALGL
OsABCT(XP_464576)           (107) NIDRVGELFVFRFERLTVEARCHVSPALTLTARNVAEALGL
SpABCT(CAA94437)           (111) NIDRVGELFVFRFERLTVEARCHVSPALTLTARNVAEALGL
OsABCT(CAD59574)           (127) NIDRVGELFVFRFERLTVEARCHVSPALTLTARNVAEALGL

```

FIGURA 37A

ZmABCT (parcial, Mo17)	(186)	CGVRLGGQARLTIRLDVSGAVRSTNTLLGPFSSSTTLLLAAGKLD
ZmABCT (Compósito)	(186)	CGVRLGGQARLTIRLDVSGAVRSTNTLLGPFSSSTTLLLAAGKLD
OsABCT (BAD53545)	(185)	VGVRPG-RQATLTIRLGVEGAVRSTNTLLGPFSSSTTLLLAAGKLD
OsABCP (NP_916719)	(199)	VGINFK-KKALHTIRLDVGIVRSTNTLLGPFSSSTTLLLAAGKLD
AtABCT (AAD39329)	(174)	IGIQFA-KKAQLTIRLDISGVKSGNTLLGPFSSSTTLLLAAGKLD
AtABCT (DAA00875)	(172)	IGIRLA-KKAQLTIRLDVGIVKSGNTLLGPFSSSTTLLLAAGKLD
AtABCT (AAD39650)	(172)	IGIRLA-KKAQLTIRLDVGIVKSGNTLLGPFSSSTTLLLAAGKLD
AtABCT (BAB01273)	(150)	IGFNFT-KTKVTTIRLDVGIIKSGNTLLGPFSSSTTLLLAAGKLD
OsABCT (XP_464576)	(157)	MRIVSS-GKRPISTLHDIQITRCSSTLLGPFSSSTTLLLAAGKLD
SpABCT (CAA94437)	(161)	LHMPS-GKRPISTIRLDVGIIKSGNTLLGPFSSSTTLLLAAGKLD
OsABCT (CAD59574)	(177)	FGSS---NKRTINLQDVGIIKSGNTLLGPFSSSTTLLLAAGKLD
ZmABCT (parcial, Mo17)	(236)	PAVVAVVGGEVSNQFRLGTVFQKTAANISQTVVVGEMTKETLD
ZmABCT (Compósito)	(236)	PAVVAVVGGEVSNQFRLGTVFQKTAANISQTVVVGEMTKETLD
OsABCT (BAD53545)	(234)	PSRRGGE---VTYNGFELEFVAOKTAANISQTVVVGEMTKETLD
OsABCP (NP_916719)	(248)	PTEETSSEVT---INRYGLDEFVQKTAANISHIVVAGEMTKETLD
AtABCT (AAD39329)	(223)	KSQVSGDIT---INRYQLDEFVPEKTSANISNLLVGINTKETLD
AtABCT (DAA00875)	(221)	KSDVSGEVT---INRYRLNEFVPIKTSANISNLLVGINTKETLD
AtABCT (AAD39650)	(221)	KSDVSGEVT---INRYRLNEFVPIKTSANISNLLVGINTKETLD
AtABCT (BAB01273)	(199)	QSKVTIRVT---INRGLEFVQKTSANISNRYVGVNTQETLD
OsABCT (XP_464576)	(206)	STKVSGRVT---INRDMDEFVQRTSANISGHDLNIGEMTKETLD
SpABCT (CAA94437)	(210)	NTKVTINVT---INRGHDEFVQRTSANISHVNVIGEMTKETLD
OsABCT (CAD59574)	(224)	KNKVSIDIT---CHTFSEFYPRTSANVSYLNNEMTKETLD
ZmABCT (parcial, Mo17)	(286)	SARQGVAKDLMTLARRREKAGRRPEPEVLFNKATSMEGVENSLO
ZmABCT (Compósito)	(286)	SARQGVAKDLMTLARRREKAGRRPEPEVLFNKATSMEGVENSLO
OsABCT (BAD53545)	(280)	SARQGVETKDLLTLARRREKAGRRPEPEVLFNKATSMEGVESSLQ
OsABCP (NP_916719)	(294)	SAQGVQRLKLLKAKKRLGLYFPEPEVLFNKATSMEG--STLO
AtABCT (AAD39329)	(269)	SARQGVETRDLNLARRREKAGRFEADVLEFNKASAAQGVKNSLV
AtABCT (DAA00875)	(267)	SARQGVETRDLNLARRREKAGRFEADVLEFNKASAAQGVKSSLT
AtABCT (AAD39650)	(267)	SARQGVETRDLNLARRREKAGRFEADVLEFNKASAAQGVKSSLT
AtABCT (BAB01273)	(245)	SARQGVETRDLNLARRREKAGRFEADVLEFNKASAAQGVKSSLT
OsABCT (XP_464576)	(252)	SARQGVETRDLMTLARRREKAGRFEADVLEFNKASAAQGVKSSLT
SpABCT (CAA94437)	(256)	SARQGVETRDLMTLARRREKAGRFEADVLEFNKASAAQGVKSSLT
OsABCT (CAD59574)	(270)	GRGLISARDLNLARRREKAGRFEADVLEFNKASAAQGVKSSLT
ZmABCT (parcial, Mo17)	(336)	EYTKILGDIKKTIVGDMMPGIGGGQKRVTTANDTVECHILRFVQK
ZmABCT (Compósito)	(336)	EYTKILGDIKKTIVGDMMPGIGGGQKRVTTANDTVECHILRFVQK
OsABCT (BAD53545)	(330)	EYTKILGDIKKTIVGDMMPGIGGGQKRVTTANDTVECHILRFVQK
OsABCP (NP_916719)	(342)	EYTKILGDMADVIVGDELRCIGGGQKRVTTANDTVECHILRFVQK
AtABCT (AAD39329)	(319)	EYTKILGDIKKTIVGDMMPGIGGGQKRVTTANDTVECHILRFVQK
AtABCT (DAA00875)	(317)	EYTKILGDIKKTIVGDMMPGIGGGQKRVTTANDTVECHILRFVQK
AtABCT (AAD39650)	(317)	EYTKILGDIKKTIVGDMMPGIGGGQKRVTTANDTVECHILRFVQK
AtABCT (BAB01273)	(295)	EYTKILGDIKKTIVGDMMPGIGGGQKRVTTANDTVECHILRFVQK
OsABCT (XP_464576)	(301)	EYTKILGDIKKTIVGDMMPGIGGGQKRVTTANDTVECHILRFVQK
SpABCT (CAA94437)	(305)	EYTKILGDIKKTIVGDMMPGIGGGQKRVTTANDTVECHILRFVQK
OsABCT (CAD59574)	(320)	EYTKILGDIKKTIVGDMMPGIGGGQKRVTTANDTVECHILRFVQK

FIGURA 37B

ZmABCT(parcial, Mol17)	(386)	KKELCFCVPLRSTHTRTDTPVLIGTQQLVAYHLVVQGFQGG	ENIVETKVI
ZmABCT(Compósito)	(386)	KKELCFCVPLRSTHTRTDTPVLIGTQQLVAYHLVVQGFQGG	ENIVETKVI
OsABCT(BAD53545)	(366)	-----	ENIVETKVI
OsABCP(NP_916719)	(378)	-----	ENIVETKVI
AtABCT(AAD39329)	(355)	-----	ENIVETKTI
AtABCT(DAA00875)	(353)	-----	ENIVETKTI
AtABCT(AAD39650)	(353)	-----	ENIVETKTI
AtABCT(BAB01273)	(331)	-----	ENIVETKTI
OsABCT(XP_464576)	(337)	-----	ENIVETKAI
SpABCT(CAA94437)	(341)	-----	ENIVETKAI
OsABCT(CAD59574)	(356)	-----	ENIVETKAI
ZmABCT(parcial, Mol17)	(436)	FNDISTGLDSTTFQIVKCLQQIHHLGEATILMSLLOPAPTFDFDI	
ZmABCT(Compósito)	(436)	FNDISTGLDSTTFQIVKCLQQIHHLGEATILMSLLOPAPTFDFDI	
OsABCT(BAD53545)	(376)	FNDISTGLDSTTFQIVKCLQQIHHLGEATILMSLLOPAPTFDFDI	
OsABCP(NP_916719)	(388)	FNDISTGLDSTTFQIVKCLQQIHHLGEATILMSLLOPAPTFDFDI	
AtABCT(AAD39329)	(365)	FNDISTGLDSTTFQIVKCLQQIHHLGEATILMSLLOPAPTFDFDI	
AtABCT(DAA00875)	(363)	FNDISTGLDSTTFQIVKCLQQIHHLGEATILMSLLOPAPTFDFDI	
AtABCT(AAD39650)	(363)	FNDISTGLDSTTFQIVKCLQQIHHLGEATILMSLLOPAPTFDFDI	
AtABCT(BAB01273)	(341)	FNDISTGLDSTTFQIVKCLQQIHHLGEATILMSLLOPAPTFDFDI	
OsABCT(XP_464576)	(347)	FNDISTGLDSTTFQIVKCLQQIHHLGEATILMSLLOPAPTFDFDI	
SpABCT(CAA94437)	(351)	FNDISTGLDSTTFQIVKCLQQIHHLGEATILMSLLOPAPTFDFDI	
OsABCT(CAD59574)	(366)	FNDISTGLDSTTFQIVKCLQQIHHLGEATILMSLLOPAPTFDFDI	
ZmABCT(parcial, Mol17)	(486)	ILLSEQIVYQSTPEYVLETFDSCGFCPEERGTADTLOEVTSKDDQGV	
ZmABCT(Compósito)	(486)	ILLSEQIVYQSTPEYVLETFDSCGFCPEERGTADTLOEVTSKDDQGV	
OsABCT(BAD53545)	(426)	ILLSEQIVYQSTPEYVLETFDSCGFCPEERGTADTLOEVTSKDDQGV	
OsABCP(NP_916719)	(438)	ILLSEQIVYQSTPEYVLETFDSCGFCPEERGTADTLOEVTSKDDQGV	
AtABCT(AAD39329)	(415)	ILLSEQIVYQSTPEYVLETFDSCGFCPEERGTADTLOEVTSKDDQGV	
AtABCT(DAA00875)	(413)	ILLSEQIVYQSTPEYVLETFDSCGFCPEERGTADTLOEVTSKDDQGV	
AtABCT(AAD39650)	(413)	ILLSEQIVYQSTPEYVLETFDSCGFCPEERGTADTLOEVTSKDDQGV	
AtABCT(BAB01273)	(391)	ILLSEQIVYQSTPEYVLETFDSCGFCPEERGTADTLOEVTSKDDQGV	
OsABCT(XP_464576)	(397)	ILLSEQIVYQSTPEYVLETFDSCGFCPEERGTADTLOEVTSKDDQGV	
SpABCT(CAA94437)	(401)	ILLSEQIVYQSTPEYVLETFDSCGFCPEERGTADTLOEVTSKDDQGV	
OsABCT(CAD59574)	(416)	ILLSEQIVYQSTPEYVLETFDSCGFCPEERGTADTLOEVTSKDDQGV	
ZmABCT(parcial, Mol17)	(536)	NADKMPYRYVSPEVAQRFKFHVVLQLENHLSLFDKSRCHQAAIVFS	
ZmABCT(Compósito)	(536)	NADKMPYRYVSPEVAQRFKFHVVLQLENHLSLFDKSRCHQAAIVFS	
OsABCT(BAD53545)	(476)	NADKMPYRYVSPEVAQRFKFHVVLQLENHLSLFDKSRCHQAAIVFS	
OsABCP(NP_916719)	(488)	NADKMPYRYVSPEVAQRFKFHVVLQLENHLSLFDKSRCHQAAIVFS	
AtABCT(AAD39329)	(465)	NADKMPYRYVSPEVAQRFKFHVVLQLENHLSLFDKSRCHQAAIVFS	
AtABCT(DAA00875)	(463)	NADKMPYRYVSPEVAQRFKFHVVLQLENHLSLFDKSRCHQAAIVFS	
AtABCT(AAD39650)	(463)	NADKMPYRYVSPEVAQRFKFHVVLQLENHLSLFDKSRCHQAAIVFS	
AtABCT(BAB01273)	(441)	NADKMPYRYVSPEVAQRFKFHVVLQLENHLSLFDKSRCHQAAIVFS	
OsABCT(XP_464576)	(447)	NADKMPYRYVSPEVAQRFKFHVVLQLENHLSLFDKSRCHQAAIVFS	
SpABCT(CAA94437)	(451)	NADKMPYRYVSPEVAQRFKFHVVLQLENHLSLFDKSRCHQAAIVFS	
OsABCT(CAD59574)	(466)	NADKMPYRYVSPEVAQRFKFHVVLQLENHLSLFDKSRCHQAAIVFS	
ZmABCT(parcial, Mol17)	(586)	KHSVSTTELLKASEDKWL IKKNSVIFFTIQLIIVALIASVFLRTH	
ZmABCT(Compósito)	(586)	KHSVSTTELLKASEDKWL IKKNSVIFFTIQLIIVALIASVFLRTH	
OsABCT(BAD53545)	(526)	KHSVSTTELLKASEDKWL IKKNSVIFFTIQLIIVALIASVFLRTH	
OsABCP(NP_916719)	(538)	KHSVSTTELLKASEDKWL IKKNSVIFFTIQLIIVALIASVFLRTH	
AtABCT(AAD39329)	(515)	KHSVSTTELLKASEDKWL IKKNSVIFFTIQLIIVALIASVFLRTH	
AtABCT(DAA00875)	(513)	KHSVSTTELLKASEDKWL IKKNSVIFFTIQLIIVALIASVFLRTH	
AtABCT(AAD39650)	(513)	KHSVSTTELLKASEDKWL IKKNSVIFFTIQLIIVALIASVFLRTH	
AtABCT(BAB01273)	(491)	KHSVSTTELLKASEDKWL IKKNSVIFFTIQLIIVALIASVFLRTH	
OsABCT(XP_464576)	(497)	KHSVSTTELLKASEDKWL IKKNSVIFFTIQLIIVALIASVFLRTH	
SpABCT(CAA94437)	(501)	KHSVSTTELLKASEDKWL IKKNSVIFFTIQLIIVALIASVFLRTH	
OsABCT(CAD59574)	(516)	KHSVSTTELLKASEDKWL IKKNSVIFFTIQLIIVALIASVFLRTH	

FIGURA 37C

ZmABCT (parcial, Mo17)	(636) MHTTNLDGQFYIALLFTLIVNMENFELSLTITRQVYKHHLFY
ZmABCT (Compósito)	(636) MHTTNLDGQFYIALLFTLIVNMENFELSLTITRQVYKHHLFY
OsABCT (BAD53545)	(576) MHTRNLDGQFYIALLFSLIVNMENCFELSLTITRQVYKHHLFY
OsABCP (NP_916719)	(588) MHTRNLDGQFYIALLFVMITNMESFELSLTLARQVYKHHLFY
AtABCT (AAD39329)	(565) MHTRNEGANDYIALLFGMITNMENFELAMMVSRQVYKHHLFY
AtABCT (DAA00875)	(563) MHTRNEIANDYVSLLFAMIVNMENLEAMMTIQRQVYKHHLFY
AtABCT (AAD39650)	(563) MHTRNEIANDYVSLLFAMIVNMENLEAMMTIQRQVYKHHLFY
AtABCT (BAB01273)	(541) MGTINESGAVYIALLFMSIVNMENFELALMIQRQVYKHHLFY
OsABCT (XP_464576)	(547) MHRRSVEGAFELAMFLGLVTHLENFELAMSIARQVYKHHLFY
SpABCT (CAA94437)	(551) LPRNGLEATIFFAMFLGLVTHLENFELAMSIARQVYKHHLFY
OsABCT (CAD59574)	(566) MPGGTISGKFLSALTFSLTITLENFELQLTIKRQVYKHHLFY
ZmABCT (parcial, Mo17)	(686) PAVFTVPNVILRIPIISIVVIVTYTIGFADAEFFKHLLLVFL
ZmABCT (Compósito)	(686) PAVFTVPNVILRIPIISIVVIVTYTIGFADAEFFKHLLLVFL
OsABCT (BAD53545)	(626) PAVFTLPNVILRIPIISIVVIVTYTIGFADAEFFKQLLLVFL
OsABCP (NP_916719)	(638) RPTTFALPNVLRIPIISIVVAITYTIGFADAEFFKHLLLVFM
AtABCT (AAD39329)	(615) PPTTFSLPTLLGIPIISIVSTAMVVTYSIGYADAEFFKQLLIFL
AtABCT (DAA00875)	(613) PPTTYTLPTLLGIPIISIVSTAMVVTYSIGYADAEFFKQLLIFL
AtABCT (AAD39650)	(613) PPTTYTLPTLLGIPIISIVSTAMVVTYSIGYADAEFFKQLLIFL
AtABCT (BAB01273)	(591) PPTTFSLPTLLGIPIISIVSVVITYTIGFADAEFFKHLLLVFL
OsABCT (XP_464576)	(597) PPTAYALPTVULKIPISIVLCVATCMIVVMFDNIEFFHHVLLVL
SpABCT (CAA94437)	(601) PPTAYALPTVULKIPISIVTCGVATAMTYVIGFDPNVVMFHHVLLVL
OsABCT (CAD59574)	(616) PPTTFVAMILLKVPVILVAAVAVVLTYSVMFAESAGFFRQFIAFFV
ZmABCT (parcial, Mo17)	(736) IQMAGGLFATAGLCRSMIIAQGALFLIFFVLSQVLPKVF PNW
ZmABCT (Compósito)	(736) IQMAGGLFATAGLCRSMIIAQGALFLIFFVLSQVLPKVF PNW
OsABCT (BAD53545)	(676) IQMAGGLFATAGLCRSMIIAQGALALIFFVLSQVLPKVF PKW
OsABCP (NP_916719)	(688) IQMAGGLFATAGLCRTVVVTINAGSLAVIMFVLQVLPKDA PKW
AtABCT (AAD39329)	(665) IQMAGSLFLLASVCRMTMIANGSALTLLVFLQVLPKQK PDW
AtABCT (DAA00875)	(663) IQMAGITFSTASTCRMTMIANGSVLVLVVFLLTQVLPKPRSE PVW
AtABCT (AAD39650)	(663) IQMAGITFSTASTCRMTMIANGSVLVLVVFLLTQVLPKPRSE PVW
AtABCT (BAB01273)	(641) TQMAGGITFSTASTCRMTMIANGSALVILLVFLQVLPKPRSE PKW
OsABCT (XP_464576)	(647) ISQMSGLFLLAALGREDVVADTFSAFQVLLVLSQVLPKREK KKW
SpABCT (CAA94437)	(651) ISQVSGLFLLAAGREDVVADTFSAFQVLLVLSQVLPKREK KKW
OsABCT (CAD59574)	(666) THQMGMAHFLGATLTMGVANFQMFVLQVLPKREK KKW
ZmABCT (parcial, Mo17)	(786) IGGVSLMLGYNALA-----
ZmABCT (Compósito)	(786) IGGVSLMLGYNALAVNEFYAPRWMNKFVLDQNGVPKRLGIAMLEGAN
OsABCT (BAD53545)	(726) IGGVSLMLGYNALAVNEFYSPRWMNKFVLDQNGVPKRLGIAMLEGAN
OsABCP (NP_916719)	(738) VVATGCSLTAYIAFSSNEMHSPRWMDKFVPDQGR----LGVALENESG
AtABCT (AAD39329)	(715) GAAVSLTAFENGVLVNEMFAPRWMNKMASSNS--TIKLGTMVLTNWD
AtABCT (DAA00875)	(713) RAAVSLTAFNAITVNELFAPRWMNKMSG-NS--TTRLGTSVLNIWD
AtABCT (AAD39650)	(713) RAAVSLTAFNAITVNELFAPRWMNKMSG-NS--TTRLGTSVLNIWD
AtABCT (BAB01273)	(691) KAAVSLTAFNAITVNEMLAPRWINQPS--DN--STSLGLAVLEIFD
OsABCT (XP_464576)	(697) IGGVSLMLAQNALAVNEFLGHSWNKVVDPTQS--NDTLGVQVLKVRG
SpABCT (CAA94437)	(701) IGGVSLMLAQNALAVNEFLGHSWNKLVDATG----QTLGERFLNRG
OsABCT (CAD59574)	(716) IGGVSLMLAQNALAVNEFLASRWAIPTDATID-EPTVGGKALKSKG

FIGURA 37D

```

ZmABCT (parcial, Mol7) (803) -----
ZmABCT (Compósito) (836) IFVDKNWYWIGAGLLGFTIFFNVLFTLSLMYLNPLG-----KPQA
OsABCT (BAD53545) (776) IFTDKNWYEWIGAGLLGFTIFFNVLFTLSLVYLNPLG-----KPQA
OsABCP (NP_916719) (784) VFTNKEWYWIATGALLGFTILFNVLFSLSLMYLNPLG-----KPOS
AtABCT (AAD39329) (763) VYHCKNWWYWISVGALLCFTALFNILFTLALTLYLNP-----LGKKAG
AtABCT (DAA00875) (760) VFDDKNWYWIGVGGLLGFTVIFNGFFTLALTLYLDP-----LGKAQA
AtABCT (AAD39650) (760) VFDDKNWYWIGVGGLLGFTVIFNGFFTLALTLYLDLTMYCMTALGKAQA
AtABCT (BAB01273) (738) IFTDPNWYWIGVGGLLGFTVIFNVLFTLALTLYLNP-----KQQA
OsABCT (XP_464576) (745) IFVDANWYWIGVGALLGVIIMLFNLFILFLEWLDPLG-----KGQA
SpABCT (CAA94437) (747) IFVDKNWYWIGVGALLGVIIMLFNLFILFLEWLDPLG-----KGQT
OsABCT (CAD59574) (765) LITSDDGGFWISIGALIGFLVFNILXILALTLYLSPGG-----SSNI

ZmABCT (parcial, Mol7) (803) -----
ZmABCT (Compósito) (877) VISEETAKEAEQNGHSGKAIRNGSTKPKDGSNLSVISEEMKEMRLSACL
OsABCT (BAD53545) (817) VISEETAKEAEQNGDARHTVRNGSTKSNG-----GNHKEMREMRLSARL
OsABCP (NP_916719) (825) ILPEETDSQENIQEGKNKAHIKQIITVETPEPVSPNSIITLDKVIQQLRG
AtABCT (AAD39329) (804) LLPEEENEQADQGKDPMRRSLSTADGNRR-----GEV
AtABCT (DAA00875) (801) ILPKEEDEEAQKAG-----
AtABCT (AAD39650) (810) ILPKEEDEEAQKAG-----
AtABCT (BAB01273) (779) VVSKENTEENRAENG-----
OsABCT (XP_464576) (786) VVSEEEELREKHVNRGTGEN-----VEILTLTGTD
SpABCT (CAA94437) (788) TVSEEEALQEKANRTGAN-----VELATRGSA
OsABCT (CAD59574) (806) IVSDEDSERDKTMKTRNEQ---QM-----SQVHNNGA

ZmABCT (parcial, Mol7) (803) -----
ZmABCT (Compósito) (927) SNCSSNGVSRMSIGSNEAAPTRGMVLPFNPLAMSFQNVNYVDMFPAEMK
OsABCT (BAD53545) (861) SNSSSNGVSRMSIGSNEAGPRRGMVLPFTPLAMSFDDVNYVDMFPAEMK
OsABCP (NP_916719) (875) YSANTSDRSHSYINAAGRTAPGRGMVLPFEPLYMSFNEINYYVDMFPLEMK
AtABCT (AAD39329) (836) AMGRMS--RDSAAEASGGAGNKKGMVLPFTPLAMSFDDVKYFVDMFPEMK
AtABCT (DAA00875) (816) -----SNKETEMESVSAKKGMLPFTPLAMSFDDVKYFVDMFPAEMK
AtABCT (AAD39650) (825) -----SNKETEMESVSAKKGMLPFTPLAMSFDDVKYFVDMFPAEMK
AtABCT (BAB01273) (794) -----SKSKSIDVKRGMVLPFTPLTMSFDNVNYVDMFPKEMK
OsABCT (XP_464576) (813) SQNSPSDANAGRGEITGADTRKRGMLPFTPLSTTFDNIRYSVDMFQEMK
SpABCT (CAA94437) (815) ATSDG----GSVEIRKDGNRKKGMVLPFTPLSTTFDNVYKSVDMFQEMK
OsABCT (CAD59574) (836) SNTSATSSIPMSGSRSTNQQSRSQIVLPFQPLSLCFNHVNYVDMFPTEMK

ZmABCT (parcial, Mol7) (803) -----
ZmABCT (Compósito) (977) EQGVQEDRLQLLKEVTGSEFRPGVLTALMGVSGAGKTTLMDVLGRKTGGY
OsABCT (BAD53545) (911) QQGVVEDRLQLLKEVTGSEFRPGVLTALMGVSGAGKTTLMDVLGRKTGGY
OsABCP (NP_916719) (925) SQGVVADRLQLLKGVTGSAFRPGVLTALMGVSGAGKTTLMDVLGRKTGGY
AtABCT (AAD39329) (884) DQGVVETRLQLLKGVTGSAFRPGVLTALMGVSGAGKTTLMDVLGRKTGGY
AtABCT (DAA00875) (857) EQGVQETRLQLLKGVTSAFRPGVLTALMGVSGAGKTTLMDVLGRKTGGY
AtABCT (AAD39650) (866) EQGVQETRLQLLKGVTSAFRPGVLTALMGVSGAGKTTLMDVLGRKTGGY
AtABCT (BAB01273) (831) EQGVVEDRLQLLKEVTGSEFRPGVLTALMGVSGAGKTTLMDVLGRKTGGY
OsABCT (XP_464576) (863) DQGVVEDRLQLLKGVTGSAFRPGVLTALMGVSGAGKTTLMDVLGRKTGGY
SpABCT (CAA94437) (860) DRGVVEDRLQLLKGVTGSAFRPGVLTALMGVSGRGTTLMDVLGRKTGGY
OsABCT (CAD59574) (886) EQGVVEDRLQLLKEVTGSEFRPGVLTALMGVSGAGKTTLMDVLGRKTGGY

```

FIGURA 37E

```

ZmABCT (parcial, Mo17)      (803) -----
ZmABCT (Compósito)          (1027) IEGDIRISGYPKNQATFARISGYCEQNDIHSPOQTVRESLIYSAFLRLPG
OsABCT (BAD53545)           (961) IEGDIRISGYPKNQATFARISGYCEQNDIHSPOQTVRESLIYSAFLRLPE
OsABCP (NP_916719)          (975) IEGDIYISGYPKNQATFARISGYCEQNDIHSPOQTVRESLIYSAFLRLPK
AtABCT (AAD39329)           (934) IEGDIRISGYPKVQETTFARISGYCEQTDIHSPOQTVRESLIYSAFLRLPK
AtABCT (DAA00875)           (907) IEGDIRISGYPKKQETTFARISGYCEQTDIHSPOQTVRESLIYSAFLRLAK
AtABCT (AAD39650)           (916) IEGDIRISGYPKKQETTFARISGYCEQTDIHSPOQTVRESLIYSAFLRLAK
AtABCT (BAB01273)           (881) IEGDIRISGYPKKQETTFARISGYCEQNDIHSPOQTVRESLIYSAFLRLPK
OsABCT (XP_464576)          (913) IEGDISISGYPKKQETTFARISGYCEQNDIHSPOQTVRESLIYSAFLRLPS
SpABCT (CAA94437)           (910) IEGDIRISGYPKNQATFARISGYCEQNDIHSPOQTVRESLIYSAFLRLPA
OsABCT (CAD59574)           (936) IEGDIRISGYPKKQETTFARISGYCEQTDIHSPOQTVRESLIYSAFLRLCS

ZmABCT (parcial, Mo17)      (803) -----
ZmABCT (Compósito)          (1077) KIGDQRIITDDIKKQFVDEVMEVELVDNLRLDAIVGLPGITGLSTEQRKRLT
OsABCT (BAD53545)           (1011) KIGDQRIITDDIKKQFVDEVMEVELVDNLRLDAIVGLPGITGLSTEQRKRLT
OsABCP (NP_916719)          (1025) EVNDOEK---K---KMFVDEVMEVELTGLRLDAIVGLPGVNGLSTEQRKRLT
AtABCT (AAD39329)           (984) EVGKDEK-----KMFVDQVMELVELDSLRLDAIVGLPGVTGLSTEQRKRLT
AtABCT (DAA00875)           (957) EVSKEDK-----KMFVDQVMELVELVDLRLDAIVGLPGVTGLSTEQRKRLT
AtABCT (AAD39650)           (966) EVSKEDK-----KMFVDQVMELVELVDLRLDAIVGLPGVTGLSTEQRKRLT
AtABCT (BAB01273)           (931) EVTKYEK-----KMFVDEVMEVELESRLDAIVGLPGITGLSTEQRKRLT
OsABCT (XP_464576)          (963) EVDSEAK-----KMFVDEVMEVELTSLRGAIVGLPGVNGLSTEQRKRLT
SpABCT (CAA94437)           (960) EVDEK---K---KMFVDEVMEVELNSLRLDAIVGLPGVTGLSTEQRKRLT
OsABCT (CAD59574)           (986) EVDTNTR-----KMFVDEVMSLVELVDLRLDAIVGLPGVSGLSTEQRKRLT

ZmABCT (parcial, Mo17)      (803) -----
ZmABCT (Compósito)          (1127) IAVELVANPSIIFMDEPTSGLDARAAAIVMRTVRNTVDTGRTVVCTIHQP
OsABCT (BAD53545)           (1061) IAVELVANPSIIFMDEPTSGLDARAAAIVMRTVRNTVDTGRTVVCTIHQP
OsABCP (NP_916719)          (1070) IAVELVANPSIIFMDEPTSGLDARAAAIVMRTVRNTVDTGRTVVCTIHQP
AtABCT (AAD39329)           (1029) IAVELVANPSIIFMDEPTSGLDARAAAIVMRAVRNTVDTGRTVVCTIHQP
AtABCT (DAA00875)           (1002) IAVELVANPSIIFMDEPTSGLDARAAAIVMRAVRNTVDTGRTVVCTIHQP
AtABCT (AAD39650)           (1011) IAVELVANPSIIFMDEPTSGLDARAAAIVMRAVRNTVDTGRTVVCTIHQP
AtABCT (BAB01273)           (976) IAVELVANPSIIFMDEPTSGLDARAAAIVMRTVRNTVDTGRTVVCTIHQP
OsABCT (XP_464576)          (1008) IAVELVANPSIIFMDEPTSGLDARAAAIVMRTVRNTVDTGRTVVCTIHQP
SpABCT (CAA94437)           (1005) IAVELVANPSIIFMDEPTSGLDARAAAIVMRAVRNTVDTGRTVVCTIHQP
OsABCT (CAD59574)           (1031) IAVELVANPSIIFMDEPTSGLDARAAAIVMRTVRNTVDTGRTVVCTIHQP

ZmABCT (parcial, Mo17)      (803) -----
ZmABCT (Compósito)          (1177) SIDIFEAFDELLLLKRGGQVIYSGKLGRNSQKMIYFEAIPGVPKIKDKY
OsABCT (BAD53545)           (1111) SIDIFEAFDELLLLKRGGQVIYSGQLGRNSQKMIYFEAIPGVPKIKDKY
OsABCP (NP_916719)          (1120) SIDIFEAFDELLLLKRGGQVIYSGPLGTNSHKVVEYFEAIPGVPKIEENR
AtABCT (AAD39329)           (1079) SIDIFEAFDELLLLKRGGQVIYAGPLGQNSHKVVEYFESFPGVSKIPEKY
AtABCT (DAA00875)           (1052) SIDIFEAFDELLLLKRGGHVIYSGPLGRNSHKVVEYFESFPGVPKIPEKY
AtABCT (AAD39650)           (1061) SIDIFEAFDELLLLKRGGHVIYSGPLGRNSHKVVEYFESFPGVPKIPEKY
AtABCT (BAB01273)           (1026) SIDIFEAFDELLLLKRGGQVIYAGPLGQNSHKVVEYFEAIPGVPKIKEY
OsABCT (XP_464576)          (1058) SIDIFEAFDELFLMKRGGEIYVGPLGRNSCHLLNYFEGIQGVRIKIDGY
SpABCT (CAA94437)           (1055) SIDIFEAFDELFLMKRGGEIYVGPLGRNSCHLLNYFEGIQGVRIKIDGY
OsABCT (CAD59574)           (1081) SIDIFEAFDELLLLKRGGQVIYAGELGRNSHKVVEYFEAIPGVPKITEGY

```

FIGURA 37F

ZmABCT (parcial, Mol17)	(803)	-----
ZmABCT (Compósito)	(1227)	NPATWMLEVSSVAEEVRLNMDFAEYKTS DLYKQNKVLVNQLSQPEPGTS
OsABCT (BAD53545)	(1161)	NPATWMLEVSSVAEEVRLNMDFAEYKTS DLYKQNKVLVNQLSQPEPGTS
OsABCP (NP_916719)	(1170)	NPATWMLDVSSAAEVRLEIDFAEYKSSSTMHQRKALVKELSNPPPGSD
AtABCT (AAD39329)	(1129)	NPATWMLEASSIAAEKLSYDFAELYNQSALHQRNKALVKELSVPPAGAS
AtABCT (DAA00875)	(1102)	NPATWMLEASSIAAEKLGVDFAELYKASALCQRNKALVQELSVPPQGAT
AtABCT (AAD39650)	(1111)	NPATWMLEASSIAAEKLGVDFAELYKASALCQRNKALVQELSVPPQGAT
AtABCT (BAB01273)	(1076)	NPATWMLEVSSMAAEAKLEIDFAEHYKTS SLYQONKNLVKELSTPPQCAS
OsABCT (XP_464576)	(1108)	NPATWMLEVTTLAQEDILGINFAEYVNSDLYQRNKTLISELSTPPPGST
SpABCT (CAA94437)	(1105)	NPATWMLEVTTISQEEILGINFAEYVNSDLYQRNKDLKELSTPPPGSK
OsABCT (CAD59574)	(1131)	NPATWMLEVTSPIAEARLNWVFAEYVANSLEYKQNELKELSTPPPGYQ
ZmABCT (parcial, Mol17)	(803)	-----
ZmABCT (Compósito)	(1277)	DLYFPTKYSQSTIGQFKACLWKQWLTWRSPDYNLVRYSFLLVALLLGS
OsABCT (BAD53545)	(1211)	DLYFPTKYSQSTIGQFKACLWKQWLTWRSPDYNLVRESFTLFTALLLGT
OsABCP (NP_916719)	(1220)	DLYFPTKYSQSTENQFKLCLWKQWWTYWRSPDYNLVRIFFALFTALLLGT
AtABCT (AAD39329)	(1179)	DLYFATQFSQNTWQFKSCLWKQWWTYWRSPDYNLVREIFTLATSLLLGT
AtABCT (DAA00875)	(1152)	DLYFATQFSQNTWQFKSCLWKQWWTYWRSPDYNLVREIFTLATSLLMIGS
AtABCT (AAD39650)	(1161)	DLYFATQFSQNTWQFKSCLWKQWWTYWRSPDYNLVREIFTLATSLLMIGS
AtABCT (BAB01273)	(1126)	DLYFSTRFSQSLLGQFKSCLWKQWITYWRTPDYNLAREFFFTLAAAVMLGS
OsABCT (XP_464576)	(1158)	DLYFPTQFSQPFETQCMACLWKQHKSYWRNPSYATRIFFTTVIALIFGT
SpABCT (CAA94437)	(1155)	DLYFATQFSQS FVMQCLACLWKQHKSYWRNPSYATRIFFTTVIALIFGT
OsABCT (CAD59574)	(1181)	DLSFPTKYSQNEYSQCIANFWKQYRXYWRNPPYNARYLMTLLNLVFGT
ZmABCT (parcial, Mol17)	(803)	-----
ZmABCT (Compósito)	(1327)	IFWRIGTNMEDATTLGMVIGAMYTAVMFIGINNCS TVQPVVSEERTVFYR
OsABCT (BAD53545)	(1261)	IFWKIGTKMGNANSLRMVIGAMYTAVMFIGINNCS TVQPIVSEERTVFYR
OsABCP (NP_916719)	(1270)	IFWRVGHKMESKDLLVIGSMYAAVVFYGFENSVTVQPVVAERTVFYR
AtABCT (AAD39329)	(1229)	VFWQIGGNRSNAGDLTMVIGALYAATVFYGINNCS TVQPMVAERTVFYR
AtABCT (DAA00875)	(1202)	VFWQIGGKRNSVQDLTMVIGALYAAVVFYGINNCS TVQPMVAERTVFYR
AtABCT (AAD39650)	(1211)	VFWQIGGKRNSVQDLTMVIGALYAAVVFYGINNCS TVQPMVAERTVFYR
AtABCT (BAB01273)	(1176)	IFWKVGTKRENANDLTKVIGAMYAAVVFYGVNNS SVQPLLAVERGVFYR
OsABCT (XP_464576)	(1208)	IFLNEGKKINKRLDLFNSIGSMYAAVVFYGIQNGQTVQPIVDVERTVFYR
SpABCT (CAA94437)	(1205)	IFWDLGKKRSTSLDLINAGSMYAAVVFYGIQNAQTVQPIVDVERTVFYR
OsABCT (CAD59574)	(1231)	VFWQKGTKISSQDLFNLGATYAATFFLGAANCITVQPVVSEERTVFYR
ZmABCT (parcial, Mol17)	(803)	-----
ZmABCT (Compósito)	(1377)	ERAAGMYSALPYATAQVVEIPYVVFQTTYYTLIVYMMISFQWTAVKFFW
OsABCT (BAD53545)	(1311)	ERAAGMYSALPYATAQVVEIPYVVFQTAYYTLIVYMMISFQWTAAKFFW
OsABCP (NP_916719)	(1320)	ERAAGMYSALPYATAQVVEIPYVVFQTVIYTLIVYMMISFQWTFKFFW
AtABCT (AAD39329)	(1279)	ERAAGMYSALPYAISQVTCLEPYVLIQTYYSLIVYMMVGFQWKAFFW
AtABCT (DAA00875)	(1252)	EKAAGMYSALPYAISQVTCLEPYVLIQTYYSLIYYSMVGFQWKAFFW
AtABCT (AAD39650)	(1261)	EKAAGMYSALPYAISQVTCLEPYVLIQTYYSLIYYSMVGFQWKAFFW
AtABCT (BAB01273)	(1226)	ERAAEMYSALPYATAQVVEIPYVLIQTYYTLIYAMMCFEWTLAKFFW
OsABCT (XP_464576)	(1258)	EKAAGMYSALPYATAQVVEIPYVLIQTYYGLIVYSLLGFQWTVKFFW
SpABCT (CAA94437)	(1255)	EKAAGMYSALPYATAQVVEIPYVLIQTYYGLIVYSLLGFQWTAAKFFW
OsABCT (CAD59574)	(1281)	ERAAGMYSALPYATAQVVEIPYVLIQTYYGLIYAMTGYQWKAFFW

FIGURA 37G

```

ZmABCT (parcial, Mo17)      (803) -----
ZmABCT (Compósito)          (1427) FFFISWFSFLYFTYYGMMVAISPNHEVASIFAAFFSEFNLFSGFFIPR
OsABCT (BAD53545)           (1361) FFFVSWFSFLYFTYYGMMTVASPNHEVAIIFAAAFYSFNLFSGFFIPR
OsABCP (NP_916719)          (1370) FFFVSWFFFLYFTYYGMMNVSVSPNLQVASIILGAFFYTFNLFSGFFIPR
AtABCT (AAD39329)           (1329) FFFVSWFSFLYFTYYGMMTVSLTPNQVASIFASAFYGFNLFSGFFIPR
AtABCT (DAA00875)           (1302) FIFINWFSFLYFTYYGMMTVSLTPNQVASIFASAFYGFNLFSGFFIPR
AtABCT (AAD39650)           (1311) FIFINWFSFLYFTYYGMMTVSLTPNQVASIFASAFYGFNLFSGFFIPR
AtABCT (BAB01273)           (1276) FFFVSWFSFLYFTYYGMMTVSLTPNQVAANFAGAFYGFNLFSGFVLP
OsABCT (XP_464576)           (1308) YHFFMFTFFMYFTTYGMMVAAMTPNSDIAAIVSTAFYCIWTFAGFLIPR
SpABCT (CAA94437)           (1305) YHFFMFTFFLYFTYYGMMVAAMTPNSDIAAIVAAAFYATWTFAGFLIPR
OsABCT (CAD59574)           (1331) FMFFIVASENYFTLEGMMLVACTPSAMLANILISEVLPFWNLFAGFLVVR

ZmABCT (parcial, Mo17)      (803) -----
ZmABCT (Compósito)          (1477) PRIPGWWYWYWCPLAWTYGLIVTQYGDLEQLISVPGES-EQTISYYV
OsABCT (BAD53545)           (1411) PRIPKWWYWYWCPLAWTYGLIVTQYGDLEQLISVPGQS-NQTISYYV
OsABCP (NP_916719)          (1420) PRIPKWWYWYWCPLAWTYGLIVSQYGDVEDFITVPGQS-DQQVRPII
AtABCT (AAD39329)           (1379) PRIPKWWYWYWCPLAWTYGLIVSQYGDVETRIQVLGGAPDLTVKQYI
AtABCT (DAA00875)           (1352) PRIPKWWYWYWCPLAWTYGLITSQYGDVETPIALLGGAPGLTVKQYI
AtABCT (AAD39650)           (1361) PRIPKWWYWYWCPLAWTYGLITSQYGDVETPIALLGGAPGLTVKQYI
AtABCT (BAB01273)           (1326) PRIPKWWYWYWCPLAWTYGLIVSQYGDVEDTIKVPGMANDPTIKWYI
OsABCT (XP_464576)           (1358) PRIPWWRWYWSWACPVAWTYGLIVASQYG---DITNSTLED-GEVVQDYI
SpABCT (CAA94437)           (1355) PRIPWWRWYWSWACPVAWTYGLIVSQYG---EYDTMSDV-DETVKDFL
OsABCT (CAD59574)           (1381) PLIPWWRWYWANPVSWTLYCYVASORGNKGDVLSVPGGS-PTVVKQET

ZmABCT (parcial, Mo17)      (803) -----
ZmABCT (Compósito)          (1526) THHFGYHRDFLPVAPVLVLFVFFFAFLYAVCIKKLNFOQR
OsABCT (BAD53545)           (1460) THHFGYHRKFMPPVAPVLVLFVFFFAFLYAIKIKLNFOQR
OsABCP (NP_916719)          (1469) KDYFGYDPDFMGVVAAVLAGFTVFFFAFLYASISITLNFOQR
AtABCT (AAD39329)           (1429) EDHYGFSQSDFMGPVAAVLIAFTVFFFAFLYAFCIKTLNFOQR
AtABCT (DAA00875)           (1402) KDQYGFESDYMGSPVAGVLVGFTVFFFAFLYAFCIKTLNFOQR
AtABCT (AAD39650)           (1411) KDQYGFESDYMGSPVAGVLVGFTVFFFAFLYAFCIKTLNFOQR
AtABCT (BAB01273)           (1376) ENHYGIDADEMIPATVVLVGFTLFFFAFMFAFGITLNFOQR
OsABCT (XP_464576)           (1404) RRYFGFRHDXLGYVATAVVGFAALFAFLYFAFSIKVFNFOQR
SpABCT (CAA94437)           (1401) RRFGLGRHDFLPVVGVMVVFVTLFASLFAFSIKTLNFOQR
OsABCT (CAD59574)           (1430) EDNLGMRHSFLGYVVLTHFGYLVVFFFLGYAIKYFNFOQR

```

FIGURA 37H

	1	50
AtNF-YB-6 (tipo LEC1)	(1)	-----MERGGFHGYRKL SVNNTTPSGPGLAANFLMREGSMRPPEFNQ
AtNF-YB-9 (LEC1)	(1)	MERGAPFSHYQLPKSISELNLDQHSNNTPMTSSVVVAGAGDK-----
OsLEC1	(1)	-----MEAGYPGTAANFAADG-----
Zm_LEC1	(1)	-----MDSSSFLAAGAENSSAGGAN-----
Zm_LEC1-like	(1)	-----MDSSFLAAG-ADNSSAGANN-----
ZmHAP3-2	(1)	-----MNNPQNPKASAPCTLPELPKEVETDEAPPPMG----
Soybean LEC1	(1)	-----MRQQQVASSDQNCNSHSSAGEE-----
wheat LEC1	(1)	-----MENDGVVNGPAAPSPQTGTP-----
AtNF-YB-4	(1)	-----
AtNF-YB-5	(1)	-----MAGNYHSFQNIIPRYQNYNFSSSSNHQHEHDG-----
Zm_HAP3L6	(1)	-----MADHHHHHHHGHGPPDPGAGD-----
Zm_HAP3L9	(1)	-----MAAGHHGQPPDEEDERRA-----
Zm_HAP3L2	(1)	-----MSHTSNFTGFSQLEHQOPQNSRASSTTH-----
OsHAP3L6	(1)	-----MADHHGGHHADGHRRQQQLQEDADQAA-----
OsHAP3L9	(1)	-----MQGLPRASSSSTSASRDRDGGDDCGGGGV-----
Consenso	(1)	-----P G AA-----

	51	100
AtNF-YB-6 (tipo LEC1)	(44)	NKTSNGGEEE--C-TTTPQKTPDANVIRIRLPAHAKISDDAKETI
AtNF-YB-9 (LEC1)	(44)	-N-NGIVVQQQPPCARELQYMEIANVIRIRKTLPAHAKISDDAKETI
OsLEC1	(18)	---NGGAQQAAAAAPADEQDPIETATVIRIRIRLPAHAKISDDAKETI
Zm_LEC1	(23)	---NGGAQQQAAPARELQRLPIANVIRIRLPAHAKISDDAKETI
Zm_LEC1-like	(21)	---GGGAQQ--APPARELQRLPIANVIRIRLPAHAKISDDAKETI
ZmHAP3-2	(35)	---NNNNTESATATARELQRLPIANVIRIRLPAHAKISDDAKETI
Soybean LEC1	(23)	-----N---ECTARELQRLPIANVIRIRLPAHAKISDDAKETI
wheat LEC1	(21)	---ARELQRLPIANVIRIRLPAHAKISDDAKETI
AtNF-YB-4	(1)	-----TTARELQRLPIANVIRIRLPAHAKISDDAKETI
AtNF-YB-5	(34)	LVVVVVEDQQQEESEARELQRLPIANVIRIRLPAHAKISDDAKETI
Zm_HAP3L6	(23)	-----Q---LEARELQRLPIANVIRIRLPAHAKISDDAKETI
Zm_HAP3L9	(19)	-----VGGARELQRLPIANVIRIRLPAHAKISDDAKETI
Zm_HAP3L2	(31)	-----DANARELQRLPIANVIRIRLPAHAKISDDAKETI
OsHAP3L6	(29)	-----AELARELQRLPIANVIRIRLPAHAKISDDAKETI
OsHAP3L9	(31)	-----TARELQRLPIANVIRIRLPAHAKISDDAKETI
Consenso	(51)	VVREQDRLMPIANV RIMR ILPAHAKISDDAKETI

A domain

B domain

	101	150
AtNF-YB-6 (tipo LEC1)	(91)	QECVSEFISFVTGEANERC RE RKTVNADVLWAMSRLGFDDYVDPL
AtNF-YB-9 (LEC1)	(92)	QECVSEFISFVTGEANERC RE RKTVNADVLWAMSRLGFDDYVDPL
OsLEC1	(65)	QECVSEFISFVTGEANERC RE RKTVNADVLWAMSRLGFDDYVDPL
Zm_LEC1	(70)	QECVSEFISFVTGEANERC RE RKTVNADVLWAMSRLGFDDYVDPL
Zm_LEC1-like	(66)	QECVSEFISFVTGEANERC RE RKTVNADVLWAMSRLGFDDYVDPL
ZmHAP3-2	(82)	QECVSEFISFVTGEANERC RE RKTVNADVLWAMSRLGFDDYVDPL
Soybean LEC1	(62)	QECVSEFISFVTGEANERC RE RKTVNADVLWAMSRLGFDDYVDPL
wheat LEC1	(57)	QECVSEFISFVTGEANERC RE RKTVNADVLWAMSRLGFDDYVDPL
AtNF-YB-4	(36)	QECVSEFISFVTGEANERC RE RKTVNADVLWAMSRLGFDDYVDPL
AtNF-YB-5	(84)	QECVSEFISFVTGEANERC RE RKTVNADVLWAMSRLGFDDYVDPL
Zm_HAP3L6	(62)	QECVSEFISFVTGEANERC RE RKTVNADVLWAMSRLGFDDYVDPL
Zm_HAP3L9	(56)	QECVSEFISFVTGEANERC RE RKTVNADVLWAMSRLGFDDYVDPL
Zm_HAP3L2	(69)	QECVSEFISFVTGEANERC RE RKTVNADVLWAMSRLGFDDYVDPL
OsHAP3L6	(67)	QECVSEFISFVTGEANERC RE RKTVNADVLWAMSRLGFDDYVDPL
OsHAP3L9	(68)	QECVSEFISFVTGEANERC RE RKTVNADVLWAMSRLGFDDYVDPL
Consenso	(101)	QECVSEFISFVTGEANERC RE RKTVNADVLWAMSRLGFDDYVDPL

FIGURA 38A

		151		200
AtNF-YB-6 (tipo LEC1)	(141)	YLRHYRE EGD	RG AG	
AtNF-YB-9 (LEC1)	(142)	YLRHYRE EGD	RG AG	
OsLEC1	(115)	YLRHYRE EGD	RG AG	
Zm_LEC1	(120)	YLRHYRE EGD	RG AG	
Zm_LEC1-like	(116)	YLRHYRE EGD	RG AG	
ZmHAP3-2	(132)	YLRHYRE EGD	RG AG	
Soybean LEC1	(112)	YLRHYRE EGD	RG AG	
wheat LEC1	(107)	YLRHYRE EGD	RG AG	
AtNF-YB-4	(86)	YLRHYRE EGD	RG AG	
AtNF-YB-5	(134)	YLRHYRE EGD	RG AG	
Zm_HAP3L6	(112)	YLRHYRE EGD	RG AG	
Zm_HAP3L9	(106)	YLRHYRE EGD	RG AG	
Zm_HAP3L2	(119)	YLRHYRE EGD	RG AG	
OshAP3L6	(117)	YLRHYRE EGD	RG AG	
OshAP3L9	(118)	YLRHYRE EGD	RG AG	
Consenso	(151)	YLRHYRE EGD	RG AG	
				
		C domain		
		201		250
AtNF-YB-6 (tipo LEC1)	(160)	PPS-----S-----VMTNQLVKKP	-----NGTMT	
AtNF-YB-9 (LEC1)	(161)	PPS-----S-----VMTNQLVKKP	-----NGTMT	
OsLEC1	(154)	PPS-----S-----VMTNQLVKKP	-----NGTMT	
Zm_LEC1	(164)	PPS-----S-----VMTNQLVKKP	-----NGTMT	
Zm_LEC1-like	(159)	PPS-----S-----VMTNQLVKKP	-----NGTMT	
ZmHAP3-2	(169)	PPS-----S-----VMTNQLVKKP	-----NGTMT	
Soybean LEC1	(135)	PPS-----S-----VMTNQLVKKP	-----NGTMT	
wheat LEC1	(156)	PPS-----S-----VMTNQLVKKP	-----NGTMT	
AtNF-YB-4	(110)	PPS-----S-----VMTNQLVKKP	-----NGTMT	
AtNF-YB-5	(161)	PPS-----S-----VMTNQLVKKP	-----NGTMT	
Zm_HAP3L6	(137)	PPS-----S-----VMTNQLVKKP	-----NGTMT	
Zm_HAP3L9	(131)	PPS-----S-----VMTNQLVKKP	-----NGTMT	
Zm_HAP3L2	(144)	PPS-----S-----VMTNQLVKKP	-----NGTMT	
OshAP3L6	(142)	PPS-----S-----VMTNQLVKKP	-----NGTMT	
OshAP3L9	(143)	PPS-----S-----VMTNQLVKKP	-----NGTMT	
Consenso	(201)	PPS-----S-----VMTNQLVKKP	-----NGTMT	
				
		A domain		
		251		300
AtNF-YB-6 (tipo LEC1)	(178)	EYGAYGPVPGIHMAYHYRH--QNGFVFSGNEP	-----NSKMSGSS----	
AtNF-YB-9 (LEC1)	(180)	EYGAYGPVPGIHMAYHYRH--QNGFVFSGNEP	-----NSKMSGSS----	
OsLEC1	(195)	EYGAYGPVPGIHMAYHYRH--QNGFVFSGNEP	-----NSKMSGSS----	
Zm_LEC1	(214)	EYGAYGPVPGIHMAYHYRH--QNGFVFSGNEP	-----NSKMSGSS----	
Zm_LEC1-like	(200)	EYGAYGPVPGIHMAYHYRH--QNGFVFSGNEP	-----NSKMSGSS----	
ZmHAP3-2	(209)	EYGAYGPVPGIHMAYHYRH--QNGFVFSGNEP	-----NSKMSGSS----	
Soybean LEC1	(153)	EYGAYGPVPGIHMAYHYRH--QNGFVFSGNEP	-----NSKMSGSS----	
wheat LEC1	(206)	EYGAYGPVPGIHMAYHYRH--QNGFVFSGNEP	-----NSKMSGSS----	
AtNF-YB-4	(128)	EYGAYGPVPGIHMAYHYRH--QNGFVFSGNEP	-----NSKMSGSS----	
AtNF-YB-5	(161)	EYGAYGPVPGIHMAYHYRH--QNGFVFSGNEP	-----NSKMSGSS----	
Zm_HAP3L6	(158)	EYGAYGPVPGIHMAYHYRH--QNGFVFSGNEP	-----NSKMSGSS----	
Zm_HAP3L9	(151)	EYGAYGPVPGIHMAYHYRH--QNGFVFSGNEP	-----NSKMSGSS----	
Zm_HAP3L2	(167)	EYGAYGPVPGIHMAYHYRH--QNGFVFSGNEP	-----NSKMSGSS----	
OshAP3L6	(166)	EYGAYGPVPGIHMAYHYRH--QNGFVFSGNEP	-----NSKMSGSS----	
OshAP3L9	(163)	EYGAYGPVPGIHMAYHYRH--QNGFVFSGNEP	-----NSKMSGSS----	
Consenso	(251)	EYGAYGPVPGIHMAYHYRH--QNGFVFSGNEP	-----NSKMSGSS----	
				
		B domain		

FIGURA 38B

	301	325
AtNF-YB-6 (tipo LEC1)	(217)	--SGASGARVEVFPTQQHKY-----
AtNF-YB-9 (LEC1)	(219)	---GGSSSSINGMPAFDHYGQYK--
OsLEC1	(233)	-GSGGAGTPQT--VNFEHQHPFGYK
Zm_LEC1	(256)	GGASASHTPQGS--GGLEHPHPFAYK
Zm_LEC1-like	(241)	-GSASHAPPGSGGGGFDHPHTFAYK
ZmHAP3-2	(250)	-----ENPPPEGRAAGSN-----
Soybean LEC1	(195)	-----
wheat LEC1	(256)	PGEGMGEPEPEPEPAAEESHDKPVQSG
AtNF-YB-4	(140)	-----
AtNF-YB-5	(161)	-----
Zm_HAP3L6	(180)	-----
Zm_HAP3L9	(172)	-----
Zm_HAP3L2	(167)	-----
OsHAP3L6	(178)	-----
OsHAP3L9	(186)	-----
Consenso	(301)	



FIGURA 38C

	67	116
AtNF-YB-6 (LEC1-like)	(57)	REQDRMPIANVISIMRRILPAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
AtNF-YB-9 (LEC1)	(58)	REQDQYMIAVIAIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
OsLEC1	(31)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
Zm LEC1	(36)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
Zm LEC1-like	(32)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
ZmHAP3-2	(48)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
LEC1 Soja	(28)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
LEC1 trigo	(23)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
AtNF-YB-4	(12)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
AtNF-YB-5	(10)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
Zm HAP3-1	(13)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
Zm HAP3-2	(14)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
Zm HAP3-3	(15)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
Zm HAP3-4	(16)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
Zm HAP3-5	(17)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
Zm HAP3-6	(18)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
Zm HAP3-7	(19)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
Zm HAP3-8	(20)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
Zm HAP3-9	(21)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
Zm HAP3-10	(22)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
Consenso	(67)	REQDRLMPIANVISIMRRVLPAAHAKISDDAKETIQCVSEYISFVTGEAN
	117	157% de identidade com ZM-
LEC1		
AtNF-YB-6 (LEC1-like)	(107)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
AtNF-YB-9 (LEC1)	(108)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
OsLEC1	(81)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
Zm LEC1	(86)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
Zm LEC1-like	(82)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
ZmHAP3-2	(98)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
LEC1 Soja	(78)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
LEC1 trigo	(73)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
AtNF-YB-4	(12)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
AtNF-YB-5	(10)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
Zm HAP3-1	(13)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
Zm HAP3-2	(14)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
Zm HAP3-3	(15)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
Zm HAP3-4	(16)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
Zm HAP3-5	(17)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
Zm HAP3-6	(18)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
Zm HAP3-7	(19)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
Zm HAP3-8	(20)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
Zm HAP3-9	(21)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
Zm HAP3-10	(22)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE
Consenso	(117)	ERQREQKXITAEIVLWAMSKLFPDDYVPLTLYLHRYRE

FIGURA 39

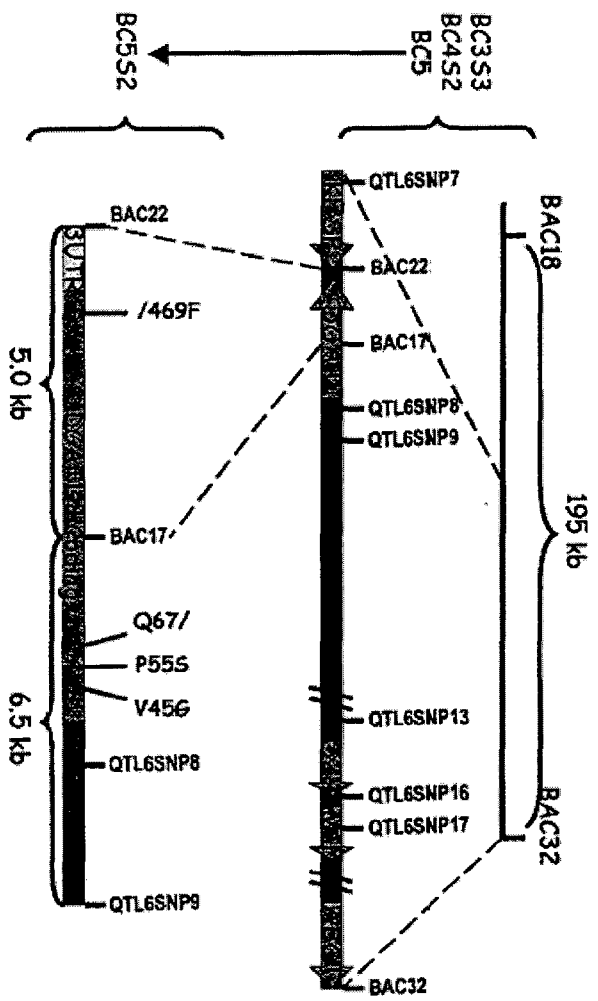


FIGURA 40

FIGURA 41A

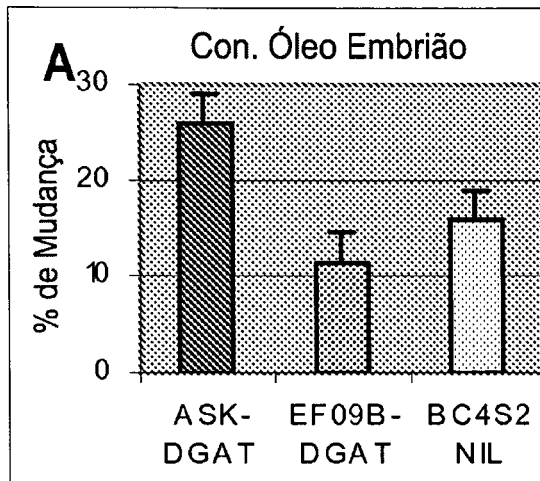


FIGURA 41B

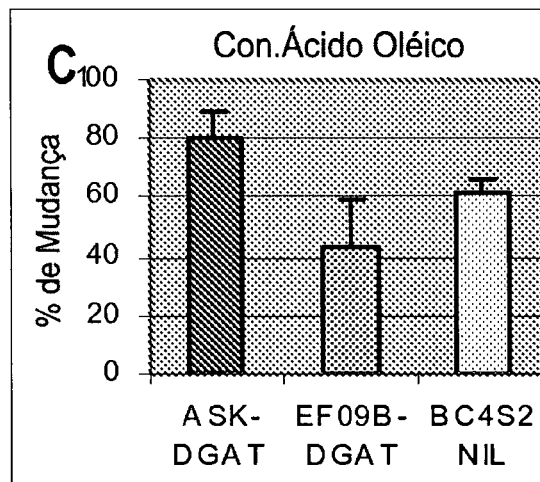
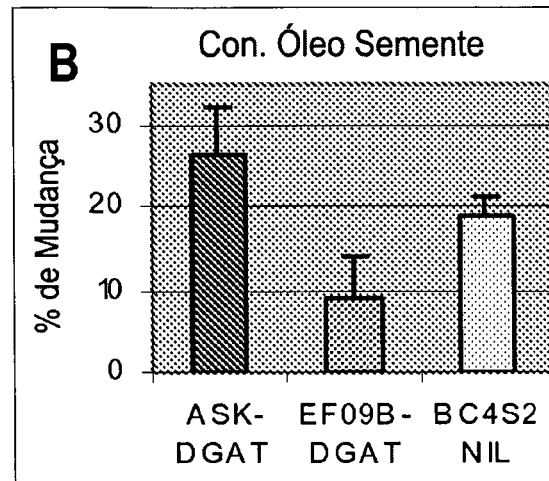


FIGURA 41C

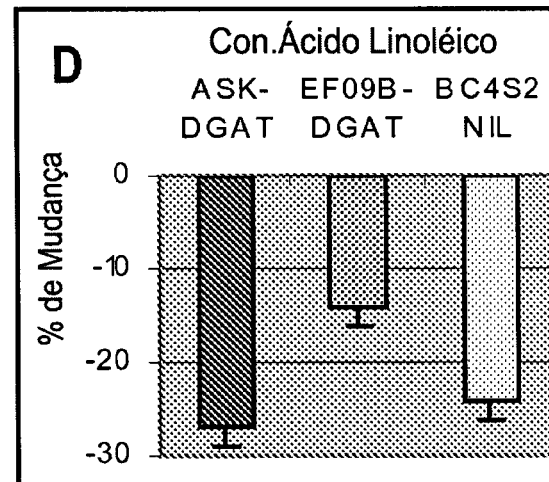


FIGURA 41D

FIGURA 42A

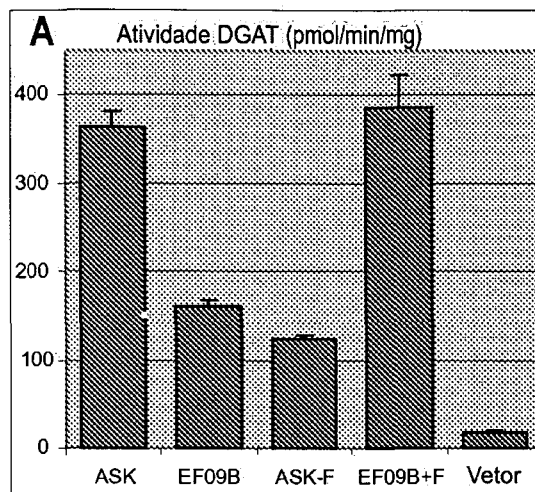


FIGURA 42B

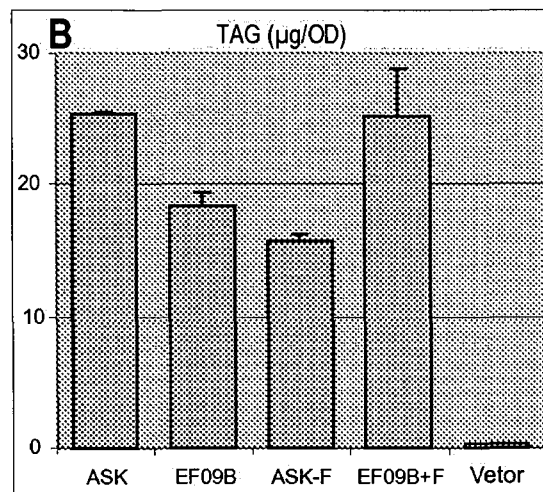


FIGURA 43A

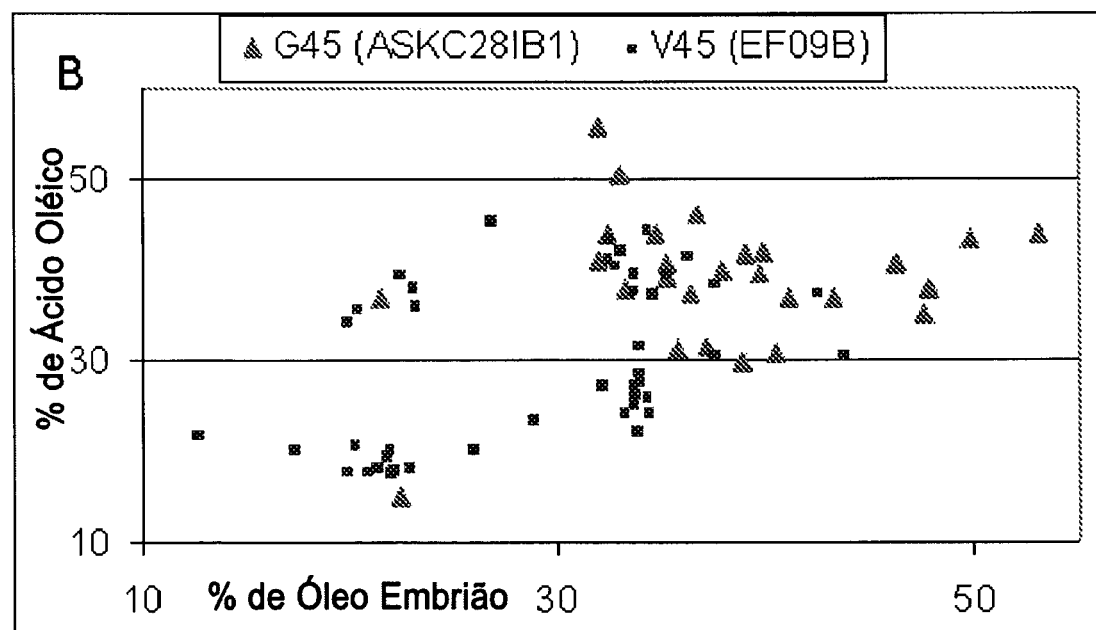
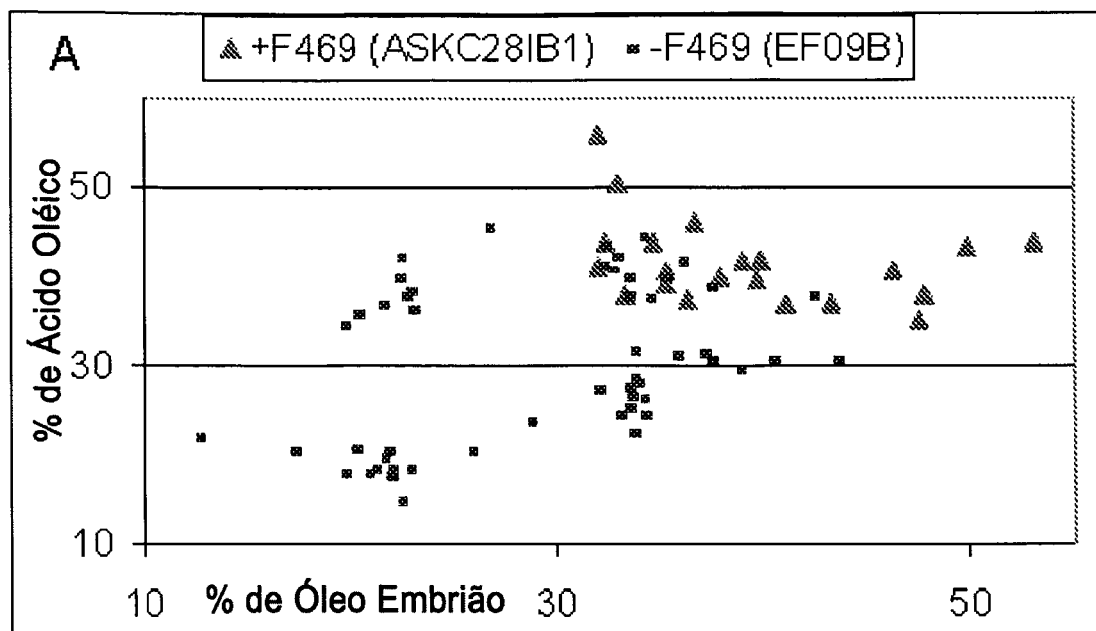


FIGURA 43B

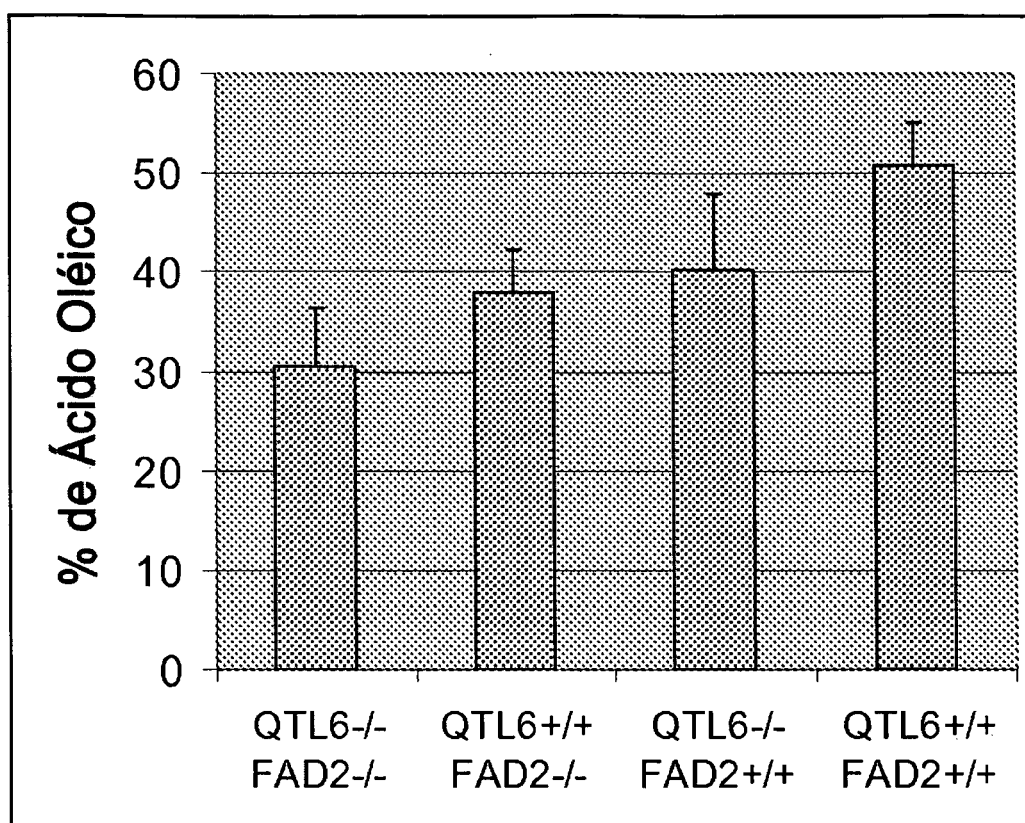


FIGURA 44