(11) Número de Publicação: **PT 2861059 T**

(51) Classificação Internacional:
A23L 33/12 (2017.01) ***C11C 3/00*** (2017.01)
C12N 15/52 (2017.01) ***C12N 15/82*** (2017.01)
A01H 5/10 (2017.01)

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

(22) Data de pedido: **2013.06.14**

(30) Prioridade(s): **2012.06.15 US**
201261660392 P 2012.06.22 US
201261663344 P 2012.09.06 US
201261697676 P 2013.03.14 US
201361782680 P

(43) Data de publicação do pedido: **2015.04.22**

(45) Data e BPI da concessão: **2017.05.03**
153/2017

(73) Titular(es):
GRAINS RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION **AU**
LEVEL 4 4 NATIONAL CIRCUIT BARTON, ACT 2600
NUSEED PTY LTD **AU**
COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION **AU**

(72) Inventor(es):
JAMES ROBERTSON PETRIE **AU**
SURINDER PAL SINGH **AU**
ROBERT CHARLES DE FEYTER **AU**

(74) Mandatário:
VASCO STILLWELL DE ANDRADE
RUA CASTILHO, 165 1070-050 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS POLINSATURADOS DE CADEIA LONGA EM CÉLULAS VEGETAIS**

(57) Resumo:
A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÁCIDOS GORDOS POLINSATURADOS, COMPREENDENDO A TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS EM LÍPIDO VEGETAL EXTRAÍDO.

RESUMOÓ

PRODUÇÃOÓDEÓÁCIDOSÓGORDOSÓPOLINSATURADOSÓDEÓCADEIAÓLONGAÓ EMÓCÉLULASÓVEGETAISÓ

A presente invenção refere-se a um processo para a produção de ésteres etílicos de ácidos gordos polinsaturados, compreendendo a transesterificação de triacilgliceróis em lípido vegetal extraído.

DESCRIÇÃOÓ

PRODUÇÃOÓDEÓÁCIDOSÓGORDOSÓPOLINSATURADOSÓDEÓCADEIAÓLONGAÓEMÓ CÉLULASÓVEGETAISÓ

CAMPOÓDAÓINVENÇÃOÓ

A presente invenção refere-se aos métodos para sintetizar ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, especialmente de ácido docosahexaenoico, em células vegetais recombinantes.

ANTECEDENTESÓDAÓINVENÇÃOÓ

Ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa ómega-3 (LC-PUFAÉ são agora amplamente reconhecidos como compostos importantes para a saúde humana e animal. Estes ácidos gordos podem ser obtidos a partir de fontes dietéticas ou pela conversão dos ácidos gordos ácido linoleico (LA, 18:2ω6É ou α-linolénico (ALA, 18:3ω3É, ambos os quais são considerados como os ácidos gordos essenciais na dieta humana. Embora os seres humanos e muitos outros animais vertebrados sejam capazes de converter LA ou ALA, obtidos a partir de fontes vegetais em C22 eles realizam esta conversão a uma taxa muito baixa. Além disso, a maioria das sociedades modernas têm dietas desequilibradas nas quais pelo menos 90 % dos ácidos gordos polinsaturados (PUFAÉ são dos ácidos gordos ω6, em vez da razão de 4:1 ou menos para ácidos gordos ω6:ω3 que é considerada como ideal (Trautwein, 2001É. A fonte dietética imediata de LC-PUFAs, como o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5ω3É e docosahexaenoico (DHA, 22:6ω3É para os seres humanos é principalmente a partir de óleo de peixe ou peixe. Os profissionais de saúde têm, portanto, recomendado a inclusão regular de peixe que contém níveis significativos de LC-PUFA na dieta humana. Cada vez mais, os óleos de peixe derivados de LC-PUFA têm sido incorporados nos produtos alimentares e em fórmulas para lactantes, por

exemplo. No entanto, devido a um declínio na pesca mundial e nacional, são necessárias fontes alternativas destes óleos que melhoram a saúde de forma benéfica.

As plantas com flores, em contraste com os animais, não têm a capacidade sintetizar os ácidos gordos polinsaturados com comprimentos de cadeia superiores a 18 átomos de carbono. Em particular, as plantas hortícolas e de cultivo, juntamente com outras angiospermas não têm as enzimas necessárias para sintetizar os ácidos gordos ω3 de cadeia mais longa, como EPA, ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5ω3É e DHA que são derivados de ALA. Um objetivo importante em biotecnologia vegetal é, por conseguinte, a engenharia de plantas de cultivo que produzem quantidades substanciais de LC-PUFA, proporcionando assim uma fonte alternativa destes compostos.

Vias de biossíntese de LC-PUFA

A biossíntese de LC-PUFAs em organismos como microalgas, musgos e fungos geralmente ocorre como uma série de reações de dessaturação e alongamento dependentes de oxigénio (Figura 1É. A via mais comum que produz EPA nestes organismos inclui uma Δ6-dessaturação, Δ6-alongamento e Δ5-dessaturação (denominada a via de Δ6-dessaturaçãoÉ, enquanto uma via menos comum utiliza um Δ9-alongamento, Δ8-dessaturação e Δ5-dessaturação (denominada a via de Δ9-dessaturaçãoÉ. Estas reações de dessaturação e alongamento consecutivas podem começar com o substrato de ácido gordo ω6 LA, mostrado esquematicamente como a parte superior esquerda da Figura 1 (ω6É ou o substrato ω3 ALA até EPA, mostrado como a parte inferior direita da Figura 1 (ω3É. Se a Δ6-dessaturação inicial é realizada sobre o substrato ω6 LA, o produto LC-PUFA da série de três enzimas será o ácido gordo ω6 ARA. Organismos que sintetizam LC-PUFA podem converter ácidos gordos ω6 em ácidos gordos ω3 usando uma ω3-dessaturase, mostrado como a etapa Δ17-dessaturase na Figura 1 para a conversão de ácido

araquidónico (ARA, 20:4ω6É em EPA. Alguns membros da família de ω3-dessaturase pode atuar sobre uma variedade substratos que variam de LA a ARA. ω3-dessaturases de plantas muitas vezes catalisam especificamente a Δ15-dessaturação de LA em ALA, enquanto as ω3-dessaturases de fungos e leveduras podem ser específicas para a Δ17-dessaturação de ARA em EPA (Pereira *et al.*, 2004a; Zank *et al.*, 2005É. Alguns relatórios sugerem que podem existir ω3-dessaturases não específicas, que podem converter uma grande variedade de substratos ω6 nos seus produtos ω3 correspondentes (Zhang *et al.*, 2008É.

A conversão de EPA em DHA nestes organismos ocorre por um Δ5-alongamento de EPA para produzir DPA, seguido por uma Δ4-dessaturação para produzir DHA (Figura 1É. Em contraste, os mamíferos usam a chamada via "Sprecher", que converte DPA em DHA através de três reações separadas, que são independentes de uma Δ4-dessaturase (Sprecher *et al.*, 1995É.

As dessaturases *front-end* geralmente encontradas em plantas, musgos, microalgas e animais inferiores como *Caenorhabditis elegans* predominantemente aceitam substratos de ácidos gordos esterificados na posição *sn*-2 de um substrato de fosfatidilcolina (PCÉ. Estas dessaturases são, portanto, conhecidas como acil-PC, ligadas a lípidos, dessaturases *front-end* (Domergue, *et al.*, 2003É. Em contraste, dessaturases *front-end* de animais superiores geralmente aceitam substratos de acil-CoA, onde o substrato de ácido gordo está ligado a CoA em vez de PC (Domergue, *et al.*, 2005É. Algumas dessaturases de microalgas e uma dessaturase de plantas são conhecidas por utilizar substratos de ácidos gordos esterificados com CoA (Quadro 2É.

Cada reação de alongamento de PUFA consiste em quatro etapas catalisadas por um complexo de proteína multicomponente: em primeiro lugar, uma reação de

condensação resulta na adição de uma unidade 2C de malonil-CoA ao ácido gordo, resultando na formação de um intermediário β-cetoacilo. Este é então reduzido por NADPH, seguido por uma desidratação para se obter um intermediário enoílo. Este intermediário é, finalmente, reduzido uma segunda vez para produzir o ácido gordo alongado. Acredita-se geralmente que a etapa de condensação destas quatro reações seja específica de substrato, enquanto as outras etapas não o são. Na prática, isto significa que a maquinaria de alongamento vegetal nativa é capaz de alongamento de PUFA contanto que a enzima de condensação (normalmente chamada uma "elongase"É específica para o PUFA é introduzida, embora a eficiência da maquinaria de alongamento vegetal nativa ao alongar os substratos PUFA não nativos possa ser baixa. Em 2007, a identificação e caracterização da desidratase do ciclo de alongamento de leveduras foi publicada (Denic e Weissman, 2007É.

A dessaturação de PUFA em plantas, musgos e microalgas ocorre naturalmente para substratos de ácidos gordos predominantemente no agrupamento de acil-PC, enquanto o alongamento ocorre para substratos no agrupamento de acil-CoA. A transferência de ácidos gordos a partir de moléculas de acil-PC para um portador de CoA é realizada por fosfolipases (PLAsÉ enquanto a transferência de ácidos gordos de acil-CoA para um portador de PC é realizada por lisofosfatidil-colina aciltransferases (LPCATsÉ (Figura 21É (Singh *et al.*, 2005É.

Produção manipulada de LC-PUFA

A maior parte da manipulação metabólica de LC-PUFA foi realizada utilizando a via aeróbica de Δ6-dessaturação/alongamento. A biossíntese de ácido γ-linolénico (GLA, 18:3ω6É em tabaco foi relatada pela primeira vez em 1996 utilizando uma Δ6-dessaturase da cianobactéria *Synechocystis* (Reddy e Thomas, 1996É. Mais recentemente, o GLA foi produzido em plantas de cultivo,

como cártamo (73 % de GLA em óleo de semente; Knauf *et al.*, 2006É e soja (28 % de GLA; Sato *et al.*, 2004É. A produção de LC-PUFA, como EPA e DHA envolve uma manipulação mais complicada devido ao maior número de etapas de dessaturação e alongamento envolvidas. A produção de EPA numa fábrica foi primeiramente relatada por Qi *et al.* (2004É que introduziu genes que codificam uma Δ9-elongase de *Isochrysis galbana*, uma Δ8-dessaturase de *Euglena gracilis* e uma Δ5-dessaturase de *Mortierella alpina* em *Arabidopsis* obtendo até 3 % de EPA. Este trabalho foi seguido por Abbadi *et al.* (2004É, que relatou a produção de até 0,8 % de EPA em sementes de linho utilizando genes que codificam uma Δ6-dessaturase e Δ6-elongase de *Physcomitrella patens* e uma Δ5-dessaturase de *Phaeodactylum tricornutum*.

O primeiro relato de produção de DHA, e até hoje os mais altos níveis de produção de VLC-PUFA relatados, foi feito no documento WO 04/017467, onde a produção de 3 % de DHA em embriões de soja é descrita, mas não de semente, por introdução de genes que codificam a Δ6-dessaturase de *Saprolegnia diclina*, a Δ6-dessaturase de *Mortierella alpina*, a Δ5-dessaturase de *Mortierella alpina*, Δ4-dessaturase *Saprolegnia diclina*, Δ17-dessaturase *Saprolegnia diclina*, a Δ6-elongase de *Mortierella alpina* e a Δ5-elongase de *Pavlova lutheri*. O nível máximo de EPA em embriões também produzindo DHA foi de 19,6 %, indicando que a eficiência de conversão de EPA em DHA era má (WO 2004/071467É. Este achado foi semelhante ao publicado por Robert *et al.* (2005É, onde o fluxo de EPA para DHA era baixo, com a produção de 3 % de EPA e 0,5 % de DHA em *Arabidopsis* usando a Δ5/6-dessaturase de *Danio rerio*, a Δ6-elongase de *Caenorhabditis elegans* e a Δ5-elongase e Δ4-dessaturase de *Pavlova salina*. A produção de EPA e DHA foi relatada utilizando a mesma combinação de enzimas do documento WO2005/103253. Também em 2005, Wu *et al.* publicaram a produção de 25 % de ARA, 15 % de EPA, e 1,5

DHA% em *Brassica juncea* usando a Δ6-dessaturase de *Pythium irregulare*, uma Δ5-dessaturase de *Thraustochytrid*, a Δ6-elongase de *Physcomitrella patens*, a Δ12-dessaturase de *Calendula officianalis*, uma Δ5-elongase de *Thraustochytrid*, a Δ17-dessaturase de *Phytophthora infestans*, a LC-PUFA elongase de *Oncorhyncus mykiss*, uma Δ4-dessaturase de *Thraustochytrid* e uma LPCAT de *Thraustochytrid* (Wu *et al.*, 2005É. Resumos dos esforços para produzir culturas oleaginosas que sintetizam LC-PUFAs ω3 são fornecidos em Venegas-Caleron *et al.* (2010É e Ruiz-Lopez *et al.*, (2012É. Tal como indicado por Ruiz-Lopez *et al.* (2012É, os resultados obtidos até ao momento para a produção de DHA em plantas transgénicas não se tem sequer aproximado dos níveis observados nos óleos de peixe.

Permanece, portanto, uma necessidade para uma produção mais eficiente de LC-PUFA em células recombinantes, em particular de DHA em sementes de oleaginosas.

SUMÁRIOÓDAÓINVENÇÃOÓ

Os presentes inventores identificaram plantas e métodos para a produção de lípidos com níveis elevados de DHA.

Num primeiro aspeto, a presente invenção proporciona lípido vegetal extraído, compreendendo ácidos gordos numa forma esterificada, os ácidos gordos compreendendo ácido oleico, ácido palmítico, ácidos gordos ω6 que compreendem o ácido linoleico (LAÉ, ácidos gordos ω3 que compreendem ácido α-linolénico (ALAÉ, e ácido docosahexaenoico (DHAÉ e, opcionalmente, um ou mais de ácido estearidónico (SDAÉ, ácido eicosapentaenoico (EPAÉ, ácido docosapentaenoico (DPAÉ e ácido eicosatetraenoico (ETAÉ, em que o nível de DHA no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é 7 % a 20 % em que o nível de ácido palmítico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 2 % e 16 % e em que o nível de ácido mirístico (C14:0É no teor total de ácidos gordos do lípido extraído é inferior a 1 %.

Numa forma de realização, o lípido extraído tem uma ou mais ou todas as seguintes características:

iÉ o nível de ácido palmítico no nível de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 2 % e 15 %,

iiÉ o nível de ácido oleico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 1 % e cerca de 30 %, entre 3 % e 30 %, entre cerca de 6 % e cerca de 30 %, entre 1 % e cerca de 20 %, entre cerca de 30 % e cerca de 60 %, entre cerca de 45 % a cerca de 60 %, ou é de cerca de 30 %,

iiiÉ o nível de ácido linoleico (LAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 4 % e 35 %, entre cerca de 4 % e cerca de 20 %, ou entre cerca de 4 % e 17 %,

ivÉ o nível de ácido α-linolénico (ALAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 4 % e cerca de 40 %, entre 7 % e 40 %, entre cerca de 10 % e cerca de 35 %, entre cerca de 20 % e cerca de 35 %, entre cerca de 4 % e cerca de 16 %, ou entre cerca de 2 % e cerca de 16 %,

vÉ o nível de ácido γ-linolénico (GLAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que 4 %, menos do que cerca de 3 %, menos do que cerca de 2 %, menos do que cerca de 1 %, menos do que cerca de 0,5 %, entre 0,05 % e cerca de 7 %, entre 0,05 % e cerca de 4 %, entre 0,05 % e cerca de 3 %, ou entre 0,05 % e cerca de 2 %,

viÉ o nível de ácido estearidónico (SDAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que cerca de 7 %, menos do que cerca de 6 %, menos do que 4 %, menos do que cerca de 3 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 7 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 6 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 4 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 3 %, ou entre 0,05 % e cerca de 2 %,

viiÉ o nível de ácido eicosatetraenoico (ETAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que

cerca de 6 %, menos do que cerca de 5 %, menos do que 4 %, menos do que cerca de 1 %, menos do que cerca de 0,5 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 6 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 5 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 4 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 3 %, ou entre cerca de 0,05 % e cerca de 2 %,

viiiÉ o nível de ácido eicosatrienoico (ETrAÉ no teor total de ácido gordo do lípido extraído é menos do que 4 %, menos do que cerca de 2 %, menos do que cerca de 1 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 4 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 3 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 2 %, ou entre cerca de 0,05 % e cerca de 1 %,

ixÉ o nível de ácido eicosapentaenoico (EPAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que 4 %, menos do que cerca de 3 %, menos do que cerca de 2 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 10 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 5 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 3 %, ou entre cerca de 0,05 % e cerca de 2 %,

xÉ o nível de ácido docosapentaenoico (DPAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que 4 %, menos do que cerca de 3 %, menos do que cerca de 2 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 8 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 5 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 3 %, ou entre cerca de 0,05 % e cerca de 2 %,

xiÉ o nível de DHA no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é de cerca de 8 %, cerca de 9 %, cerca de 10 %, cerca de 11 %, cerca de 12 %, cerca de 13 %, cerca de 14 %, cerca de 15 %, cerca de 16 %, cerca de 17 %, cerca de 18 %, entre cerca de 8 % e 20 %, entre cerca de 10 % e 20 %, entre 11 % e 20 %, entre cerca de 10 % e cerca de 16 %, ou entre cerca de 14 % e 20 %,

xiiÉ o lípido compreende ácido ω6-docosapentaenoico ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$É no seu teor de ácidos gordos,

xiiiÉ o lípido é essencialmente livre de ácido ω6-docosapentaenoico ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$É no seu teor de ácidos

gordos,
xivÉ o lípido é essencialmente livre de SDA, EPA e ETA no seu teor de ácidos gordos,
xvÉ o nível de ácidos gordos saturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 4 % e 25 %, entre cerca de 4 % e cerca de 20 %, entre cerca de 6 % e cerca de 20 %, entre cerca de 4 % e cerca de 60 %, entre cerca de 30 % e cerca de 60 %, ou entre cerca de 45 % e cerca de 60 %,
xviÉ o nível de ácidos gordos monoinsaturados no total no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 4 % e 35 %, entre cerca de 8 % e cerca de 25 %, ou entre 8 % e cerca de 22 %,
xviiÉ o nível de ácidos gordos polinsaturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 20 % e 75 %, entre cerca de 50 % e cerca de 75 %, ou entre cerca de 60 % e cerca de 75 %,
xviiiÉ o nível de ácidos gordos ω6 totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 35 % e cerca de 50 %, entre cerca de 20 % e cerca de 35 %, entre cerca de 6 % e 20 %, menos de 20 %, menos do que cerca de 16 %, menos do que cerca de 10 %, entre cerca de 1 % e cerca de 16 %, entre cerca de 2 % e cerca de 10 %, ou entre cerca de 4 % e cerca de 10 %,
xixÉ o nível de novos ácidos gordos ω6 no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos de 10 %, menos do que cerca de 8 %, menos do que cerca de 6 %, menos do que 4 %, entre cerca de 1 % e cerca de 20 %, entre cerca de 1 % e cerca de 10 %, entre cerca de 0,5 % e cerca de 8 %, ou entre cerca de 0,5 % e 4 %,
xxÉ o nível de ácidos gordos ω3 totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 36 % e cerca de 65 %, entre 40 % e 60 %, entre cerca de 20 % e cerca de 35 %, entre cerca de 10 % e cerca de 20 %, cerca de 25 %, cerca de 30 %, cerca de 35 % ou cerca de 40 %,

xxiÉ o nível de novos ácidos gordos ω3 no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 9 % e 33 %, entre cerca de 10 % e cerca de 20 %, entre cerca de 20 % e cerca de 30 %, entre cerca de 12 % e cerca de 25 %, cerca de 13 %, cerca de 15 %, cerca de 17 % ou cerca de 20 %,

xxiiÉ a razão de ácidos gordos ω6 totais:ácidos gordos ω3 totais no teor de ácidos gordos do lípido extraído é entre 1,0 e 3,0, entre cerca de 0,1 e cerca de 1, entre cerca de 0,1 e cerca de 0,5, menos do que cerca de 0,50, menos do que cerca de 0,40, menos do que cerca de 0,30, menos do que cerca de 0,20, menos do que cerca de 0,15, cerca de 1,0, cerca de 0,1 ou cerca de 0,2,

xxiiiiÉ a razão de novos ácidos gordos ω6: novos ácidos gordos ω3 no teor de ácidos gordos do lípido extraído é entre 1,0 e 3,0, entre cerca de 0,1 e cerca de 1, entre cerca de 0,1 e cerca de 0,5, menos do que cerca de 0,50, menos do que cerca de 0,40, menos do que cerca de 0,30, menos do que cerca de 0,20, menos do que cerca de 0,15, cerca de 0,1, cerca de 0,2 ou cerca de 1,0,

xxivÉ a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se na eficiência de conversão de ácido oleico em LA por Δ12-dessaturase de pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 80 %, entre cerca de 60 % e cerca de 98 %, entre cerca de 70 % e cerca de 95 %, ou entre cerca de 75 % e cerca de 90 %,

xxvÉ a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se numa eficiência de conversão de ALA em SDA por Δ6-dessaturase de pelo menos cerca de 30 %, pelo menos cerca de 40 %, pelo menos cerca de 50 %, pelo menos cerca de 60 %, em menos cerca de 70 %, entre cerca de 30 % e cerca de 70 %, entre cerca de 35 % e cerca de 60 %, ou entre cerca de 50 % e cerca de 70 %,

xxviÉ a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se numa eficiência de conversão do ácido SDA a ETA por Δ6-elongase de pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de

70 %, pelo menos cerca de 75 %, entre cerca de 60 % e cerca de 95 %, entre cerca de 70 % e cerca de 88 %, ou entre cerca de 75 % e cerca de 85 %,

xxviiÉ a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se numa eficiência de conversão de ETA para EPA por Δ5-dessaturase de pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, entre cerca de 60 % e cerca de 99 %, entre cerca de 70 % e cerca de 99 %, ou entre cerca de 75 % e cerca de 98 %,

xxviiiÉ a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se numa eficiência de conversão de EPA em DPA por Δ5-elongase de pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, entre cerca de 50 % e cerca de 95 %, ou entre cerca de 85 % e cerca de 95 %,

xxixÉ a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se numa eficiência de conversão de DPA em DHA por Δ4-dessaturase de pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 93 %, entre cerca de 50 % e cerca de 95 %, entre cerca de 80 % e cerca de 95 %, ou entre cerca de 85 % e cerca de 95 %,

xxxÉ a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se numa eficiência de conversão de ácido oleico em DHA de pelo menos 10 %, pelo menos cerca de 15 %, pelo menos cerca de 20 %, entre cerca de 10 % e cerca de 50 %, entre cerca de 10 % e cerca de 30 %, ou entre cerca de 10 % e cerca de 25 %,

xxxiÉ a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se numa eficiência de conversão de LA em DHA de pelo menos cerca de 15 %, pelo menos cerca de 20 %, pelo menos cerca de 22 %, pelo menos cerca de 25 %, entre cerca de 15 % e cerca de 50 %, entre cerca de 20 % e cerca de 40 %, ou entre cerca de 20 % e cerca de 30 %,

xxxiiÉ a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se numa eficiência de conversão de ALA em DHA de pelo menos 17 %, pelo menos cerca de 22 %, pelo menos cerca de 24 %,

entre cerca de 17 % e cerca de 55 %, entre cerca de 22 % e cerca de 35 %, ou entre cerca de 24 % e cerca de 35 %,

xxxiiiÉ os ácidos gordos totais no lípido extraído têm menos de 1 % de C20:1,

xxxivÉ o teor de triacilgliceróis (TAGÉ do lípido é de pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 90 %, em menos 95 %, entre cerca de 70 % e cerca de 99 %, ou entre cerca de 90 % e cerca de 99 %,

xxxvÉ o lípido compreende diacilglicerol (DAGÉ,

xxxviÉ o lípido compreende menos de 10 %, menos do que cerca de 5 %, menos do que cerca de 1 %, ou entre cerca de 0,001 % e cerca de 5 %, ácidos gordos livres (não esterificadosÉ e/ou fosfolípidos, ou menos do que 0,5 %, ácidos gordos livres (não esterificadosÉ e/ou fosfolípidos,

xxxviiÉ pelo menos 70 %, ou pelo menos 80 %, do DHA esterificado sob a forma de TAG é na posição *sn*-1 ou posição *sn*-3 do TAG,

xxxviiiÉ as espécies de TAG contendo DHA mais abundantes no lípido é DHA/18:3/18:3 (TAG 58:12É, e

xxxixÉ o lípido compreende tri-DHA TAG (TAG 66:18É.

Noutra forma de realização, o lípido extraído está na forma de um óleo, em que pelo menos cerca de 90 %, ou menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 98 %, ou entre cerca de 95 % e cerca de 98 %, em peso, do óleo é o lípido.

Num aspeto, o lípido ou o óleo, preferentemente um óleo de semente, tem as seguintes características: no teor de ácidos gordos total do lípido ou óleo, o nível de DHA é entre cerca de 7 % e 20 %, o nível de ácido palmítico é entre cerca de 2 % e cerca de 16 %, o nível de ácido mirístico é menos do que cerca de 6 %, o nível de ácido oleico é entre cerca de 1 % e cerca de 30 %, o nível de LA é entre cerca de 4 % e cerca de 35 %, ALA está presente, GLA está presente, o nível de SDA é entre cerca de 0,05 % e cerca de 7 %, o nível de ETA é menos do que cerca de 4 %, o

nível de EPA é entre cerca de 0,05 % e cerca de 10 %, o nível de DPA, é entre cerca de 0,05 % e cerca de 8 %, o nível de ácidos gordos saturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 4 % e cerca de 25 %, o nível de ácidos gordos totais monoinsaturados no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 4 % e cerca de 35 %, o nível de ácidos gordos polinsaturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 20 % e cerca de 75 %, a razão de ácidos gordos ω6 totais: ácidos gordos ω3 totais no teor de ácidos gordos do lípido extraído é entre cerca de 0,05 e cerca de 3,0, a razão de novos ácidos gordos ω6: novos ácidos gordos ω3 no teor de ácidos gordos do lípido extraído é entre cerca de 0,03 e cerca de 3,0, preferentemente menos do que cerca de 0,50, a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se em: uma eficiência de conversão de ácido oleico em LA por Δ12-dessaturase de pelo menos cerca de 60 %, uma eficiência de conversão de ácido SDA para ácido ETA por Δ6-elongase de pelo menos cerca de 60 %, uma eficiência de conversão de EPA em DPA por Δ5-elongase de entre cerca de 50 % e cerca de 95 %, uma eficiência de conversão de DPA em DHA por Δ4-dessaturase de entre cerca de 50 % e cerca de 95 %, uma eficiência de conversão de ácido oleico em DHA de pelo menos cerca de 10 %, e o teor de triacilgliceróis (TAGÉ do lípido é de pelo menos cerca de 70 % e, opcionalmente, o lípido é essencialmente livre de colesterol e/ou o lípido compreende tri-DHA TAG (TAG 66:18É.

Noutro aspeto, o lípido ou o óleo, preferentemente um óleo de semente, tem as seguintes características: no teor de ácidos gordos total do lípido, o nível de DHA é entre cerca de 7 % e 20 %, o nível de ácido palmítico é entre cerca de 2 % e cerca de 16 %, o nível de ácido miristico é menos do que cerca de 2 %, o nível de ácido oleico é entre cerca de 1 % e cerca de 30 %, o nível de LA é entre cerca

de 4 % e cerca de 35 %, o nível de ALA é entre cerca de 7 % e cerca de 40 %, o nível de GLA é menos do que cerca de 4 %, o nível de SDA é entre cerca de 0,05 % e cerca de 7 %, o nível de ETA é menos do que cerca de 4 %, o nível de ETrA é entre cerca de 0,05 % e cerca de 4 %, o nível de EPA é entre cerca de 0,05 % e cerca de 10 %, o nível de DPA, é entre cerca de 0,05 % e cerca de 8 %, o nível de ácidos gordos saturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 4 % e cerca de 25 %, o nível de ácidos gordos totais monoinsaturados no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 4 % e cerca de 35 %, o nível de ácidos gordos polinsaturado totais no teor de ácido gordo do lípido extraído é entre cerca de 20 % e cerca de 75 %, o nível de novos ácidos gordos ω6 no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 0,5 % e cerca de 10 %, o nível de ácidos gordos ω3 totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 36 % e cerca de 75 %, o nível de novos ácidos gordos ω3 no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 9 % e cerca de 33 %, a razão de ácidos gordos ω6 totais: ácidos gordos ω3 totais no teor de ácidos gordos do lípido extraído é entre cerca de 0,05 e cerca de 3,0, a razão de novos ácidos gordos ω6: novos ácidos gordos ω3 no teor de ácido gordo do lípido extraído é entre cerca de 0,03 e cerca de 3,0, a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se em: uma eficiência de conversão de ácido oleico em LA por Δ12-dessaturase de pelo menos cerca de 60 %, uma eficiência de conversão de SDA em ácido ETA por Δ6-elongase de pelo menos cerca de 60 %, uma eficiência de conversão de ETA em EPA de Δ5-dessaturase de pelo menos cerca de 60 %, uma eficiência de conversão de EPA a DPA por Δ5-elongase de entre cerca de 50 % e cerca de 95 %, uma eficiência de conversão de DPA em DHA por Δ4-dessaturase de entre cerca de 50 % e cerca de 95 %, uma eficiência de conversão de ácido oleico em DHA de pelo

menos cerca de 10 %, uma eficiência de conversão de LA em DHA de pelo menos cerca de 15 %, uma eficiência de conversão de ALA em DHA de pelo menos cerca de 17 %, e o nível total de ácidos gordos no lípido extraído tem menos de 1 % de C20:1, o teor de triacilglicerol (TAGÉ do lípido é pelo menos cerca de 70 %, o lípido é essencialmente livre de colesterol, e o lípido compreende tri-DHA TAG (TAG 66:18É. Preferentemente, o lípido ou o óleo é óleo de canola e/ou não foi tratado com um processo de transesterificação depois de ser extraído a partir da planta ou parte da planta. Num aspeto particular, o lípido ou óleo de canola podem, subsequentemente, ser tratados para converter os ácidos gordos no óleo nos ésteres alquílicos, como ésteres metílicos ou etílicos. O tratamento adicional pode ser aplicado para enriquecer o lípido ou o óleo para o DHA.

Num aspeto, o lípido ou o óleo, preferentemente um óleo de semente, tem as seguintes características: no teor de ácidos gordos total do lípido, o nível de DHA é entre cerca de 7 % e 20 %, o nível de ácido palmítico é entre cerca de 2 % e cerca de 16 %, o nível de ácido mirístico é menos do que cerca de 2 %, o nível de ácido oleico é entre cerca de 30 % e cerca de 60 %, preferentemente entre cerca de 45 % e cerca de 60 %, o nível de LA é entre cerca de 4 % e cerca de 20 %, o nível de ALA é entre cerca de 2 % e cerca de 16 %, o nível de GLA é menos do que cerca de 3 %, o nível de SDA é menos do que cerca de 3 %, o nível de ETA é inferior cerca de 4 %, o nível de ETrA é menos do que cerca de 2 %, o nível de EPA é menos do que cerca de 4 %, o nível de DPA é menos do que cerca de 4 %, o nível de ácidos gordos saturados totais no teor total de ácido gordo do lípido extraído é entre cerca de 4 % e cerca de 25 %, o nível de ácidos gordos monoinsaturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 30 % e cerca de 60 %, ou entre cerca de 40 % e cerca de

60 %, o nível de ácidos gordos polinsaturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 20 % e cerca de 75 %, o nível de novos ácidos gordos ω6 no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 0,5 % e cerca de 10 %, o nível de ácidos gordos ω3 totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 10 % e cerca de 20 %, o nível de novos ácidos gordos ω3 no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 9 % e cerca de 20 %, a proporção de ácidos gordos totais ω6:ácidos gordos ω3 totais no teor de ácidos gordos do lípido extraído é entre cerca de 0,05 e cerca de 3,0, preferentemente menos do que cerca de 0,50, a proporção de novos ácidos gordos ω6:novos ácidos gordos ω3 no teor de ácidos gordos do lípido extraído é entre cerca de 0,03 e cerca de 3,0, o teor de triacilglicerol (TAGÉ do lípido é de pelo menos cerca de 70 %, o lípido é essencialmente livre de colesterol, e o lípido compreende tri-DHA TAG (TAG 66:18É. Preferentemente, o lípido ou o óleo é essencialmente livre de SDA, ETA e EPA e/ou é óleo de canola e/ou não foi tratado com um processo de transesterificação depois de ser extraído a partir da parte da planta ou planta. Num aspeto particular, o lípido ou o óleo de canola podem ser subsequentemente tratados para converter os ácidos gordos no óleo em ésteres alquílicos, como ésteres metílicos ou etílicos. O tratamento adicional pode ser aplicado para enriquecer o lípido ou o óleo para o DHA.

Num aspeto adicional, o lípido ou o óleo, preferentemente um óleo de semente, tem as seguintes características: no teor de ácidos gordos total do lípido ou óleo, o nível de DHA é entre cerca de 7 % e 20 %, o nível de ácido palmítico é entre cerca de 2 % e cerca de 16 %, o nível de ácido mirístico é menos do que cerca de 6 %, o nível de ácido oleico é entre cerca de 1 % e cerca de 30 %, o nível de LA é entre cerca de 4 % e cerca de

35 %, ALA está presente, GLA está presente, o nível de SDA é entre cerca de 0,05 % e cerca de 7 %, o nível de ETA é menos do que cerca de 6 %, o nível de EPA é entre cerca de 0,05 % e cerca de 10 %, o nível de DPA, é entre cerca de 0,05 % e cerca de 8 %.

Numa forma de realização adicional, o lípido extraído compreende ainda um ou mais esteróis, preferentemente esteróis vegetais.

Numa forma de realização adicional, o lípido extraído está sob a forma de um óleo, e compreende menos de 10 mg de esteróis/g de óleo, menos de 7 mg de esteróis/g de óleo, entre 1,5 mg e 10 mg de esteróis/g de óleo, ou entre 1,5 mg e 7 mg de esteróis/g de óleo.

Exemplos de esteróis que podem estar no lípido extraído incluem, mas não estão necessariamente limitados a, um ou mais ou todos de campesterol/24-metilcolesterol, Δ5-estigmasterol, eburicol, β-sitosterol/24-etilcolesterol, Δ5-avenasterol/isofucosterol, Δ7-estigmasterol/stigmast-7-en-3β-ol e Δ7-avenasterol.

Numa forma de realização, a espécie de planta é uma listada no Quadro 26, como canola, e o nível de esteróis é praticamente o mesmo como o listado no Quadro 26 para essa espécie de planta em particular.

Numa forma de realização, o lípido extraído compreende menos do que cerca de 0,5 mg de colesterol/g de óleo, menos do que cerca de 0,25 mg de colesterol/g de óleo, entre cerca de 0 mg e cerca de 0,5 mg de colesterol/g de óleo, ou entre cerca de 0 mg e cerca de 0,25 mg de colesterol/g de óleo, ou o que é essencialmente livre de colesterol.

Numa forma de realização adicional, o lípido é um óleo, preferentemente óleo a partir de uma semente oleaginosa. Exemplos de tais óleos incluem, entre outros, óleo de *Brassica sp.*, como óleo de canola, óleo de *Gossypium hirsutum*, óleo de *Linum usitatissimum*, óleo de *Helianthus* sp., óleo de *Carthamus tinctorius*, óleo de

Glycine max, óleo de *Zea mays*, óleo de *Arabidopsis thaliana*, óleo de *Sorghum bicolor*, óleo de *Sorghum vulgare*, óleo *Avena sativa*, óleo de *Trifolium* sp., Trifolium de *Elaesis guineenis*, óleo de *Nicotiana benthamiana*, óleo de *Hordeum vulgare*, óleo de *Lupinus angustifolius*, óleo de *Oryza sativa*, óleo de *Oryza glaberrima*, óleo de *Camelina sativa*, óleo de *Crambe abyssinica*, óleo de *Miscanthus x giganteus*, ou óleo de *Miscanthus sinensis*.

Também é descrito um lípido vegetal extraído, preferentemente óleo de semente de canola extraído, que compreende os ácidos gordos numa forma esterificada, os ácidos gordos que compreendem ácido oleico, ácido palmítico, ácidos gordos ω6 que compreendem o ácido linoleico (LAÉ, os ácidos gordos ω3 que compreendem ácido α-linolénico (ALAÉ, e ácido docosahexaenoico (DHAÉ e, opcionalmente, um ou mais de ácido estearidónico (SDAÉ, ácido eicosapentaenoico (EPAÉ, ácido docosapentaenoico (DPAÉ e ácido eicosatetraenoico (ETAÉ, em que o lípido tem as seguintes características no teor de ácidos gordos total do lípido;

iÉ o nível de DHA é de cerca de 3 %, cerca de 4 %, cerca de 5 %, cerca de 6 % ou cerca de 7 %,

iiÉ o nível de ácido palmítico é entre cerca de 2 % e cerca de 16 %,

iiiÉ o nível de ácido mirístico é menos do que cerca de 2 %,

ivÉ o nível de ácido oleico é entre cerca de 30 % e cerca de 60 %, preferentemente entre cerca de 45 % e cerca de 60 %,

vÉ o nível de LA é entre cerca de 4 % e cerca de 20 %,

viÉ o nível de ALA é entre cerca de 2 % e cerca de 16 %,

viiÉ o nível de GLA é menos do que cerca de 4 %,

viiiÉ o nível de SDA é menos do que cerca de 6 %, ou menos do que cerca de 4 %,

ixÉ o nível de ETA é menos do que cerca de 6 %, ou menos

do que cerca de 4 %,
xÉ o nível de ETrA é menos do que cerca de 1 %,
xiÉ o nível de EPA é menos do que cerca de 10 % e/ou o nível de EPA é 0,5-2,0 vezes o nível de DHA,
xiiÉ o nível de DPA é menos do que cerca de 4 %,
xiiiÉ o nível de ácidos gordos saturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 4 % e cerca de 25 %,
xivÉ o nível de ácidos gordos monoinsaturados totais no teor total de ácido gordo do lípido extraído é entre cerca de 30 % e cerca de 70 %,
xvÉ o nível de ácidos gordos polinsaturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 15 % e cerca de 75 %, preferentemente entre cerca de 15 % e cerca de 30 %,
xviÉ o nível de novos ácidos gordos ω6 no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 0,5 % e cerca de 10 %,
xviiÉ o nível de ácidos gordos ω3 totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 10 % e cerca de 20 %,
xviiiÉ o nível dos novos ácidos gordos ω3 no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 3 % e cerca de 20 %,
xixÉ a proporção de ácidos gordos ω6 totais : ácidos gordos ω3 totais no teor de ácidos gordos do lípido extraído é entre cerca de 0,05 e cerca de 3,0, preferentemente menos do que cerca de 0,50,
xxÉ a razão de novos ácidos gordos ω6: novos ácidos gordos ω3 no conteúdo de ácidos gordos do lípido extraído é entre cerca de 0,03 e cerca de 3,0,
xxiÉ o teor de triacilgliceróis (TAGÉ do lípido é de pelo menos cerca de 70 %, e
xxiiÉ o lípido é essencialmente livre de colesterol. Num aspeto, o lípido compreende tri-DHA TAG (TAG 66:18É. Mais

preferentemente, o lípido é essencialmente livre de SDA e ETA, e/ou não foi tratado com um processo de transesterificação depois de ser extraído a partir da parte da planta ou planta.

Noutro aspeto, é descrito um lípido vegetal extraído, que compreende os ácidos gordos sob uma forma esterificada, os ácidos gordos compreendendo ácido oleico, ácido palmítico, ácidos gordos ω6 que compreendem o ácido linoleico (LAÉ, os ácidos gordos ω3 que compreendem ácido α-linolénico (ALAÉ e ácido docosahexaenoico (DHAÉ, e um ou mais de ácido estearidónico (SDAÉ, ácido eicosapentaenoico (EPAÉ, ácido docosapentaenoico (DPAÉ e ácido eicosatetraenoico (ETAÉ, em que (iÉ o nível de DHA no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 7 % e 20 %, (iiÉ o nível de ácido palmítico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 2 % e 16 %, (iiiÉ o nível de ácido mirístico (C14:0É no teor total de ácido gordo do lípido extraído é menos do que 6 %, (ivÉ o nível de ácido oleico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 1 % e 30 % ou entre 30 % e 60 %, (vÉ o nível de ácido linoleico (LAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 4 % e 35 %, (viÉ o nível de ácido α-linolénico (ALAÉ no teor total de ácido gordo da lípido extraído é entre 4 % e 40 %, (viiÉ o nível de ácido eicosatrienoico (ETrAÉ no teor total de ácido gordo do lípido extraído é menos do que 4 %, (viiiÉ o nível de ácidos gordos saturados totais no teor total de ácidos gordos do lípido extraído é entre 4 % e 25 %, (ixÉ a razão de ácidos gordos ω6 totais:ácidos gordos ω3 totais no teor de ácidos gordos do lípido extraído é entre 1,0 e 3,0 ou entre 0,1 e 1, (xÉ o teor de triacilgliceróis (TAGÉ no lípido é de pelo menos 70 %, e (xiÉ pelo menos 70 % de DHA esterificado sob a forma de TAG está na posição *sn*-1 ou posição *sn*-3 do TAG. Num aspeto, uma ou mais ou todas das seguintes características

iÉ o nível de ácido palmítico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 2 % e 15 %,
iiÉ o nível de ácido mirístico (C14:0É no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que 1 %,
iiiÉ o nível de ácido oleico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 3 % e cerca de 30 %, entre cerca de 6 % e cerca de 30 %, entre 1 % e cerca de 20 %, entre cerca de 45 % e cerca de 60 %, ou é de cerca de 30 %,
ivÉ o nível de ácido linoleico (LAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 4 % e cerca de 20 %, ou entre cerca de 4 % e 17 %,
vÉ o nível de ácido α-linolénico (ALAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 7 % e cerca de 40 %, entre cerca de 10 % e cerca de 35 %, entre cerca de 20 % e cerca de 35 %, ou entre cerca de 4 % e 16 %,
viÉ o nível de ácido γ-linolénico (GLAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que 4 %, menos do que cerca de 3 %, menos do que cerca de 2 %, menos do que cerca de 1 %, menos do que cerca de 0,5 %, entre 0,05 % e 7 %, entre 0,05 % e 4 %, ou entre 0,05 % e cerca de 3 %, ou entre 0,05 % e cerca de 2 %,
viiÉ o nível de ácido estearidónico (SDAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que cerca de 4 %, menos do que cerca de 3 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 7 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 4 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 3 %, ou entre 0,05 % e cerca de 2 %,
viiiÉ o nível de ácido eicosatetraenoico (ETAÉ no teor total de ácido gordo do lípido extraído é menos do que cerca de 4 %, menos do que cerca de 1 %, menos do que cerca de 0,5 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 5 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 4 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 3 %, ou entre cerca de 0,05 % e cerca

de 2 %,

ixÉ o nível de ácido eicosatrienoico (ETrAÉ no teor total de ácido gordo do lípido extraído é menos do que cerca de 2 %, menos do que cerca de 1 %, entre 0,05 % e 4 %, entre 0,05 % e 3 %, ou entre 0,05 % e cerca de 2 %, ou entre 0,05 % e cerca de 1 %,

xÉ o nível de ácido eicosapentaenoico (EPAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que 4 %, menos do que cerca de 3 %, menos do que cerca de 2 %, entre 0,05 % e 10 %, entre 0,05 % e 5 %, ou entre 0,05 % e cerca de 3 %, ou entre 0,05 % e cerca de 2 %,

xiÉ o nível de ácido docosapentaenoico (DPAÉ no teor total de ácido gordo do lípido extraído é menos do que 4 %, menos do que cerca de 3 %, menos do que cerca de 2 %, entre 0,05 % e 8 %, entre 0,05 % e 5 %, ou entre 0,05 % e cerca de 3 %, ou entre 0,05 % e cerca de 2 %,

xiiÉ o nível de DHA no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é de cerca de 8 %, cerca de 9 %, cerca de 10 %, cerca de 11 %, cerca de 12 %, cerca de 13 %, cerca de 14 %, cerca de 15 %, sobre 16 %, cerca de 17 %, cerca de 18 %, entre cerca de 8 % e 20 %, entre cerca de 10 % e 20 %, entre cerca de 11 % e 20 %, entre cerca de 10 % e cerca de 16 %, ou entre cerca de 14 % e 20 %,

xiiiÉ o lípido compreende ácido ω6-docosapentaenoico ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$É no seu teor de ácidos gordos,

xivÉ o lípido é essencialmente livre de ácido ω6-docosapentaenoico ($22:5^{\Delta 4,7,10,13,16}$É no seu teor de ácidos gordos,

xvÉ o lípido é essencialmente livre de SDA, EPA e ETA no seu teor de ácidos gordos,

xviÉ o nível de ácidos gordos saturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 4 % e cerca de 20 %, ou entre cerca de 6 % e cerca de 20 %,

xviiÉ o nível de ácidos gordos monoinsaturados no teor de

ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 4 % e cerca de 35 %, entre cerca de 8 % e cerca de 25 %, ou entre 8 % e cerca de 22 %,

xviiiÉ o nível de ácidos gordos polinsaturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 20 % e cerca de 75 %, entre cerca de 50 % e cerca de 75 %, ou entre cerca de 60 % e cerca de 75 %,

xixÉ o nível de ácidos gordos ω6 totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 35 % e cerca de 50 %, entre cerca de 20 % e cerca de 35 %, entre cerca de 6 % e 20 %, menos do que 20 %, menos do que cerca de 16 %, menos do que cerca de 10 %, entre cerca de 1 % e cerca de 16 %, entre cerca de 2 % e cerca de 10 %, ou entre cerca de 4 % e cerca de 10 %,

xxÉ o nível de novos ácidos gordos ω6 no total de ácido gordo nível do lípido extraído é menos do que cerca de 10 %, menos do que cerca de 8 %, menos do que cerca de 6 %, menos do que 4 %, entre cerca de 1 % e cerca de 20 %, entre cerca de 1 % e cerca de 10 %, entre cerca de 0,5 % e cerca de 8 %, ou entre cerca de 0,5 % e 4 %,

xxiÉ o nível de ácidos gordos ω3 totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 36 % e cerca de 65 %, entre 40 % e cerca de 60 %, entre cerca de 20 % e cerca de 35 %, entre cerca de 10 % e cerca de 20 %, cerca de 25 %, cerca de 30 %, cerca de 35 % ou cerca de 40 %,

xxiiÉ o nível de novos ácidos gordos ω3 no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 9 % e cerca de 33 %, entre cerca de 10 % e cerca de 20 %, entre cerca de 20 % e cerca de 30 %, entre cerca de 12 % e cerca de 25 %, cerca de 13 %, cerca de 15 %, cerca de 17 % ou cerca de 20 %,

xxiiiÉ a proporção de ácidos gordos ω6 totais:ácidos gordos ω3 totais no nível de ácidos gordos do lípido extraído é entre cerca de 0,1 e cerca de 0,5, menos do que cerca de 0,50, menos do que cerca de 0,40, menos do

que cerca de 0,30, menos do que cerca de 0,20, menos do que cerca de 0,15, cerca de 1,0, cerca de 0,1 ou cerca de 0,2,

xxivÉ a razão de novos ácidos gordos ω6:novo ácidos gordos ω3 no teor de ácidos gordos do lípido extraído é entre cerca de 1,0 e cerca de 3,0, entre cerca de 0,1 e cerca de 1, entre cerca de 0,1 e cerca de 0,5, menos do que cerca de 0,50, menos do que cerca de 0,40, menos do que cerca de 0,30, menos do que cerca de 0,20, menos do que cerca de 0,15, cerca de 0,1, cerca de 0,2 ou cerca de 1,0,

xxvÉ a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se na eficiência de conversão de ácido oleico em DHA de pelo menos cerca de 10 %, pelo menos cerca de 15 %, pelo menos cerca de 20 %, entre cerca de 10 % e cerca de 50 %, entre cerca de 10 % e cerca de 30 %, ou entre cerca de 10 % e cerca de 25 %,

xxviÉ a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se na eficiência de conversão de LA em DHA de pelo menos cerca de 15 %, pelo menos cerca de 20 %, pelo menos cerca de 22 %, pelo menos cerca de 25 %, entre cerca de 15 % e cerca de 50 %, entre cerca de 20 % e cerca de 40 %, ou entre cerca de 20 % e cerca de 30 %,

xxviiÉ a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se na eficiência de conversão de ALA em DHA de pelo menos cerca de 17 %, pelo menos cerca de 22 %, pelo menos cerca de 24 %, entre cerca de 17 % e cerca de 55 %, entre cerca de 22 % e cerca de 35 %, ou entre cerca de 24 % e cerca de 35 %,

xxviiiÉ os ácidos gordos totais no lípido extraído têm menos de 1 % de C20:1,

xxixÉ o teor de triacilgliceróis (TAGÉ no lípido é de pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos 95 %, entre cerca de 70 % e cerca de 99 %, ou entre cerca de 90 % e cerca de 99 %,

xxxÉ o lípido compreende diacilglicerol (DAGÉ,

xxxiÉ o lípido compreende menos do que cerca de 10 %, menos do que cerca de 5 %, menos do que cerca de 1 %, ou entre cerca de 0,001 % e cerca de 5 %, ácidos gordos livres (não esterificadosÉ e/ou fosfolípidos, ou é essencialmente livre dos mesmos,

xxxiiÉ pelo menos 80 % do DHA esterificado sob a forma de TAG é na posição *sn*-1 ou posição *sn*-3 do TAG,

xxxiiiÉ a espécie de TAG contendo DHA mais abundante no lípido é DHA/18:3/18:3 (TAG 58:12É, e

xxxivÉ o lípido compreende tri-DHA TAG (TAG 66:18É.

Em relação ao aspeto específico acima, num aspeto

iÉ o lípido está sob a forma de um óleo, em que o óleo compreende um ou mais esteróis, como um ou mais ou todos de campesterol, Δ5-estigmasterol, eburicol, β-sitosterol, Δ5-avenasterol, Δ7-estigmasterol e Δ7-avenasterol, e, opcionalmente, o óleo compreende menos do que 10 mg de esteróis/g de óleo e/ou o óleo é essencialmente livre de colesterol, e/ou

iiÉ o lípido está sob a forma de um óleo a partir de uma semente oleaginosa como uma semente oleaginosa de *Brassica* sp. ou semente de canola.

Noutro aspeto, a presente invenção proporciona um processo para a produção de lípido vegetal extraído, compreendendo as etapas de

iÉ obter uma parte de planta compreendendo lípido, o lípido compreendendo ácidos gordos sob uma forma esterificada, os ácidos gordos compreendendo ácido oleico, ácido palmítico, ácidos gordos ω6 que compreendem o ácido linoleico (LAÉ, os ácidos gordos ω3 compreendendo ácido α-linolénico (ALAÉ, e ácido docosahexaenoico (DHAÉ e, opcionalmente, um ou mais de ácido eicosapentaenoico (EPAÉ, o ácido estearidónico (SDAÉ, ácido docosapentaenoico (DP AÉ e ácido eicosatetraenoico (ETAÉ, em que o nível de DHA no teor de ácidos gordos total de

lípido extraível na parte da planta é de 7 % a 20 %, e em que o nível de ácido palmítico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 2 % e 16 %, e em que o nível de ácido mirístico (C14:0É no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é inferior a 1 %, e

iiÉ extrair lípido a partir da parte da planta,

em que o nível de DHA no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é de 7 % a 20 %, e em que o nível de ácido palmítico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 2 % e 16 %, e em que o nível de ácido mirístico (C14:0É no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é inferior a 1 %.

Numa forma de realização preferida, o lípido extraído tem uma ou mais das características definidas acima.

Numa forma de realização, a parte da planta é uma semente, preferentemente, uma semente oleaginosa. Exemplos de tais sementes incluem, entre outras, *Brassica sp.*, *Gossypium* hirsutum, *Linum usitatissimum*, *Helianthus* sp., *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Avena sativa*, *Trifolium* sp., Elaesis guineenis, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Camelina sativa*, ou *Crambe abyssinica*, preferentemente uma semente de *Brassica napus*, *B. juncea* ou *C. sativa*.

Noutra forma de realização, a semente compreende, pelo menos, cerca de 18 mg, pelo menos, cerca de 22 mg, pelo menos, cerca de 26 mg, entre cerca de 18 mg e cerca de 100 mg, entre cerca de 22 mg e cerca de 70 mg, ou entre cerca de 24 mg e cerca de 50 mg de DHA, por grama de semente.

Numa forma de realização adicional, a parte da planta compreende polinucleótidos exógenos que codificam um dos seguintes conjuntos de enzimas;

iÉ uma ω3-dessaturase, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ6-elongase e uma

Δ5-elongase,

iiÉ uma Δ15-dessaturase, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ6-elongase e uma Δ5-elongase,

iiiÉ uma Δ12-dessaturase, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ6-elongase e uma Δ5-elongase,

ivÉ uma Δ12-dessaturase, uma ω3-dessaturase ou uma Δ15-dessaturase, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ6-elongase e uma Δ5-elongase

vÉ uma ω3-dessaturase, uma Δ8-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ9-elongase e uma Δ5-elongase,

viÉ uma Δ15-dessaturase, uma Δ8-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ9-elongase e uma Δ5-elongase

viiÉ uma Δ12-dessaturase, uma Δ8-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ9-elongase e uma Δ5-elongase, ou

viiiÉ uma Δ12-dessaturase, uma ω3-dessaturase ou uma Δ15-dessaturase, uma Δ8-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ9-elongase e uma Δ5-elongase

e em que cada polinucleótido está operativamente ligado a um ou mais promotores que são capazes de direcionar a expressão dos ditos polinucleótidos numa célula da parte da planta.

Ainda numa forma de realização adicional, a parte da planta tem uma ou mais ou todas as seguintes características:

iÉ a Δ12-dessaturase converte o ácido oleico a ácido linoleico numa ou mais células da planta com uma eficiência de pelo menos 60 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 80 %, entre cerca de 60 % e cerca de 98 %, entre cerca de 70 % e cerca de 95 %, ou entre cerca de 75 % e cerca de 90 %,

iiÉ a ω3-dessaturase converte ácidos gordos ω6 em ácidos gordos ω3 numa ou mais células da planta com uma eficiência de pelo menos 65 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 85 %, entre cerca de 65 % e cerca de 95 %, entre cerca de 75 % e cerca de 95 %, ou entre cerca de 80 % e cerca de 95 %,

iiiÉ a Δ6-dessaturase converte ALA em SDA numa ou mais células da planta com uma eficiência de pelo menos 30 %, pelo menos cerca de 40 %, pelo menos cerca de 50 %, pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 70 %, entre cerca de 30 % e cerca de 70 %, entre cerca de 35 % e cerca de 60 %, ou entre cerca de 50 % e cerca de 70 %,

ivÉ a Δ6-dessaturase converte o ácido linoleico em ácido γ-linolénico numa ou mais células da planta com uma eficiência de menos de 5 %, menos do que cerca de 2,5 %, menos do que cerca de 1 %, entre cerca de 0,1 % e cerca de 5 %, entre cerca de 0,5 % e cerca de 2,5 %, ou entre cerca de 0,5 % e cerca de 1 %,

vÉ a Δ6-elongase converte SDA para a ETA numa ou mais células da planta com uma eficiência de pelo menos 60 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, entre cerca de 60 % e cerca de 95 %, entre cerca de 70 % e cerca de 88 %, ou entre cerca de 75 % e cerca de 85 %,

viÉ a Δ5-dessaturase converte o ETA em EPA numa ou mais células da planta com uma eficiência de pelo menos 60 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 90 %, entre cerca de 60 % e cerca de 99 %, entre cerca de 70 % e cerca de 99 %, ou entre cerca de 75 % e cerca de 98 %,

viiÉ a Δ5-elongase converte EPA em DPA numa ou mais células da planta com uma eficiência de pelo menos 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, entre cerca de 50 % e cerca de 95 %, ou entre cerca de 85 % e cerca de 95 %,

viiiÉ a Δ4-dessaturase converte DPA a DHA numa ou mais

células da planta com uma eficiência de pelo menos 80 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 93 %, entre cerca de 50 % e cerca de 95 %, entre cerca de 80 % e cerca de 95 %, ou entre cerca de 85 % e cerca de 95 %,

ixÉ A eficiência da conversão de ácido oleico em DHA numa ou mais células da parte da planta é pelo menos 10 %, pelo menos cerca de 15 %, pelo menos cerca de 20 %, entre cerca de 10 % e cerca de 50 %, entre cerca de 10 % e cerca de 30 %, ou entre cerca de 10 % e cerca de 25 %,

xÉ a eficiência de conversão de LA em DHA numa ou mais células da parte da planta é pelo menos 15 %, pelo menos cerca de 20 %, pelo menos cerca de 22 %, pelo menos cerca de 25 %, entre cerca de 15 % e cerca de 50 %, entre cerca de 20 % e cerca de 40 %, ou entre cerca de 20 % e cerca de 30 %,

xiÉ a eficiência da conversão de ALA em DHA numa ou mais células da parte da planta é pelo menos 17 %, pelo menos cerca de 22 %, pelo menos cerca de 24 %, entre cerca de 17 % e cerca de 55 %, entre cerca de 22 % e cerca de 35 %, ou entre cerca de 24 % e cerca de 35 %,

xiiÉ uma ou mais células da parte da planta compreende pelo menos 15 %, pelo menos cerca de 20 %, entre cerca de 15 % e cerca de 30 %, ou entre cerca de 22,5 % e cerca de 27,5 %, mais ácidos gordos ω3 do que as células correspondentes desprovidas dos polinucleótidos exógenos,

xiiiÉ a Δ6-dessaturase preferentemente dessatura ácido α-linolénico (ALAÉ em relação ao ácido linoleico (LAÉ,

xivÉ a Δ6-elongase também tem atividade Δ9-elongase

xvÉ a Δ12-dessaturase também tem atividade Δ15-dessaturase,

xviÉ a Δ6-dessaturase também tem atividade Δ8-dessaturase,

xviiÉ a Δ8-dessaturase também tem atividade Δ6-dessaturase ou não tem atividade Δ6-dessaturase,

xviiiÉ a Δ15-dessaturase também tem atividade ω3-

dessaturase em GLA,

xixÉ a ω3-dessaturase também tem atividade Δ15-dessaturase em LA,

xxÉ a ω3-dessaturase dessatura ambos LA e/ou GLA,

xxiÉ a ω3-dessaturase preferentemente dessatura GLA em relação à LA,

xxiiÉ o nível de DHA na parte da planta baseia-se numa eficiência de conversão de ácido oleico em DHA na parte de planta de pelo menos 10 %, pelo menos cerca de 15 %, pelo menos cerca de 20 %, entre cerca de 10 % e cerca de 50 %, entre cerca de 15 % e cerca de 30 %, ou entre cerca de 20 % e cerca de 25 %,

xxiiiÉ o nível de DHA na parte da planta baseia-se numa eficiência de conversão de LA em DHA na parte de planta de pelo menos 15 %, pelo menos cerca de 20 %, pelo menos cerca de 22 %, entre cerca de 15 % e cerca de 60 %, entre cerca de 20 % e cerca de 40 %, ou entre cerca de 22 % e cerca de 30 %,

xxivÉ o nível de DHA na parte da planta baseia-se numa eficiência de conversão de ALA em DHA na parte de planta de pelo menos 17 %, pelo menos cerca de 22 %, pelo menos cerca de 24 %, entre cerca de 17 % e cerca de 65 %, entre cerca de 22 % e cerca de 35 %, ou entre cerca de 24 % e cerca de 35 %

xxxÉ uma ou mais ou todas as dessaturases têm maior atividade num substrato de acil-CoA do que num substrato de acil-PC correspondente,

xxxiÉ a Δ6-dessaturase tem maior atividade Δ6-dessaturase em ALA do que em LA como substrato de ácidos gordos,

xxxiiÉ a Δ6-dessaturase tem uma maior atividade Δ6-dessaturase em ALA-CoA como substrato de ácidos gordos do que em ALA unida na posição *sn*-2 de PC como substrato de ácido gordo,

xxxiiiÉ a Δ6-dessaturase tem pelo menos 2 vezes maior atividade Δ6-dessaturase, pelo menos, 3 vezes maior

atividade, pelo menos, 4 vezes maior atividade, ou, pelo menos, 5 vezes maior atividade, em ALA como um substrato em comparação com LA,

xxxivÉ a Δ6-dessaturase tem maior atividade em ALA-CoA como substrato de ácido gordo do que em ALA unido na posição *sn*-2 de PC como substrato de ácido gordo,

xxxvÉ a Δ6-dessaturase tem pelo menos 5 vezes maior atividade Δ6-dessaturase ou, pelo menos, 10 vezes maior atividade, em ALA-CoA como substrato de ácido gordo do que o ALA unido na posição *sn*-2 de PC como substrato de ácidos gordos,

xxxviÉ a dessaturase é uma dessaturase *front-end*,

xxxviiÉ a Δ6-dessaturase não tem atividade Δ5-dessaturase detetável em ETA.

Ainda numa forma de realização adicional, a parte da planta tem uma ou mais ou todas as seguintes características:

iÉ a Δ12-dessaturase compreende os aminoácidos tendo uma sequência como fornecida na SEQ ID NO: 10, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 50 % idêntica à SEQ ID NO: 10,

iiÉ a ω3-dessaturase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 12, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 50 % idêntica à SEQ ID NO: 12,

iiiÉ a Δ6-dessaturase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 16, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 50 % idêntica à SEQ ID NO: 16,

ivÉ a Δ6-elongase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 25, um fragmento biologicamente ativo da mesma, como SEQ ID NO: 26, ou uma

sequência de aminoácidos que é pelo menos 50 % idêntica à SEQ ID NO: 25 e/ou SEQ ID NO: 26,

vÉ a Δ5-dessaturase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 30, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 50 % idêntica à SEQ ID NO: 30,

viÉ a Δ5-elongase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 37, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 50 % idêntica à SEQ ID NO: 37,

viiÉ a Δ4-dessaturase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 41, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 50 % idêntica à SEQ ID NO: 41.

Numa forma de realização, a parte da planta compreende ainda um polinucleótido exógeno que codifica uma aciltransferase diacilglicerol (DGATÉ, monoacilgliceróis aciltransferase (MGATÉ, glicerol 3-fosfato aciltransferase (GPATÉ, 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferase (LPAATÉ preferentemente um LPAAT que pode usar um substrato de acil-CoA gordo polinsaturado C22, acil-CoA: lisofosfatidilcolina aciltransferase (LPCATÉ, fosfolipase A_2 ($PLA_2É$, fosfolipase C (PLCÉ, fosfolipase D (PLDÉ, CDP-colina diacilglicerol colina fosfotransferase (CPTÉ, fosfatidilcolina diacilglicerol aciltransferase (PDATÉ, fosfatidilcolina:diacilglicerol colina fosfotransferase (PDCTÉ, acil-CoA sintetase (SCAÉ, ou uma combinação de duas ou mais das mesmas.

Noutra forma de realização, a parte da planta compreende ainda uma mutação introduzida ou um polinucleótido exógeno que regula de forma negativa a produção e/ou atividade de uma enzima endógena numa célula

da parte da planta selecionada a partir de FAE1, DGAT, MGAT, GPAT, LPAAT, LPCAT, PLA_2, PLC, PLD, CPT, PDAT, uma tioesterase, como FATB, ou uma Δ12-dessaturase, ou uma combinação de duas ou mais das mesmas.

Numa forma de realização adicional, pelo menos um, ou todos, os promotores são promotores específicos de sementes. Numa forma de realização, pelo menos um, ou todos, os promotores foram obtidos a partir de genes da biossíntese de óleo ou de acumulação, como oleosina, ou a partir de genes de proteínas de armazenamento de sementes, como conlinina.

Noutra forma de realização, o(sÉ promotor(esÉ que dirigem a expressão dos polinucleótidos exógenos que codificam a Δ4-dessaturase e a Δ5-elongase iniciam a expressão dos polinucleótidos na semente em desenvolvimento da parte da planta antes, ou alcançam a expressão de pico antes, os promotores direcionando a expressão dos polinucleótidos exógenos que codificam a Δ12-dessaturase e o ω3-dessaturase.

Numa forma de realização adicional, os polinucleótidos exógenos estão covalentemente ligados numa molécula de ADN, preferentemente uma molécula de T-ADN, integrada no genoma de células da parte da planta preferentemente onde o número de tais moléculas de ADN integrado no genoma das células da parte da planta não é mais do que um, dois ou três, ou é de dois ou três.

Ainda noutra forma de realização, a planta compreende pelo menos dois polinucleótidos exógenos diferentes, cada um codificando uma Δ6-dessaturase que têm a mesma ou diferentes sequências de aminoácidos.

Numa forma de realização adicional, o teor de óleo total da parte da planta que compreende os polinucleótidos exógenos é pelo menos 40 %, ou pelo menos cerca de 50 %, ou pelo menos cerca de 60 %, ou pelo menos cerca de 70 %, ou entre cerca de 50 % e cerca de 80 % do teor total de óleo

de uma parte da planta correspondente desprovida dos polinucleótidos exógenos. Nestas formas de realização, o teor máximo de óleo pode ser de cerca de 100 % do teor de óleo de uma parte de planta tipo selvagem correspondente.

Noutra forma de realização, o lípido está sob a forma de um óleo, preferentemente um óleo de semente de uma semente oleaginosa, e em que pelo menos 90 %, ou cerca de menos 95 %, pelo menos cerca de 98 %, ou entre cerca de 95 % e cerca de 98 %, por peso do lípido é triacilglicerol.

Numa forma de realização adicional, o processo compreende ainda tratar o lípido para aumentar o nível de DHA como uma percentagem do teor total de ácidos gordos. Por exemplo, o tratamento é a transesterificação. Por exemplo, o lípido como óleo de canola pode ser tratado para converter os ácidos gordos no óleo em ésteres alquílicos, como ésteres metílicos ou etílicos, que podem depois ser fracionados para enriquecer o lípido ou o óleo para o DHA.

Adicionalmente, é descrito um processo para a produção de lípidos vegetais extraídos, compreendendo as etapas de

iÉ obter uma parte da planta, preferentemente semente de canola, compreendendo lípido, o lípido compreendendo ácidos gordos numa forma esterificada, os ácidos gordos compreendendo ácido oleico, ácido palmítico, ácidos gordos ω6 que compreendem o ácido linoleico (LAÉ, os ácidos gordos ω3 que compreendem ácido α-linolénico (ALAÉ, e ácido docosahexaenoico (DHAÉ e, opcionalmente, um ou mais de ácido eicosapentaenoico (EPAÉ, o ácido estearidónico (SDAÉ, ácido docosapentaenoico (DPAÉ e ácido eicosatetraenoico (ETAÉ, em que o nível de DHA no teor total de ácidos gordos de lípido extraível na parte da planta é de cerca de 3 %, cerca de 4 %, cerca de 5 %, cerca de 6 % ou cerca de 7 %, e

iiÉ extrair lípido a partir da parte da planta,

em que o lípido extraído tem as seguintes características no teor de ácidos gordos total do lípido;

iÉ o nível de DHA é de cerca de 3 %, cerca de 4 %, cerca de 5 %, cerca de 6 % ou cerca de 7 %,
iiÉ o nível de ácido palmítico é entre cerca de 2 % e cerca de 16 %,
iiiÉ o nível de ácido mirístico é menos do que cerca de 2 %,
ivÉ o nível de ácido oleico é entre cerca de 30 % e cerca de 60 %, preferentemente entre cerca de 45 % e cerca de 60 %,
vÉ o nível de LA é entre cerca de 4 % e cerca de 20 %,
viÉ o nível de ALA é entre cerca de 2 % e cerca de 16 %,
viiÉ o nível de GLA é menos do que cerca de 4 %,
viiiÉ o nível de SDA é menos do que cerca de 6 %, ou menos do que cerca de 4 %,
ixÉ o nível de ETA é menos do que cerca de 6 %, ou menos do que cerca de 4 %,
xÉ o nível de ETrA é menos do que cerca de 1 %,
xiÉ o nível de EPA é menos do que cerca de 10 % e/ou o nível de EPA é 0,5-2,0 vezes o nível de DHA,
xiiÉ o nível de DPA é menos do que cerca de 4 %,
xiiiÉ o nível de ácidos gordos saturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 4 % e cerca de 25 %,
xivÉ o nível de ácidos gordos monoinsaturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 30 % e cerca de 70 %,
xvÉ o nível de ácidos gordos polinsaturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 15 % e cerca de 75 %, preferentemente entre cerca de 15 % e cerca de 30 %,
xviÉ o nível de novos ácidos gordos ω6 no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 0,5 % e cerca de 10 %,
xviiÉ o nível de ácidos gordos ω3 totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de

10 % e cerca de 20 %,

xviiiÉ o nível dos novos ácidos gordos ω3 no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 3 % e cerca de 20 %,

xixÉ a razão de ácidos gordos ω6 totais : ácidos gordos ω3 totais no teor de ácidos gordos do lípido extraído é entre cerca de 0,05 e cerca de 3,0, preferentemente menos do que cerca de 0,50,

xxÉ a razão de novos ácidos gordos ω6: novos ácidos gordos ω3 no conteúdo de ácidos gordos do lípido extraído é entre cerca de 0,03 e cerca de 3,0,

xxiÉ o teor de triacilgliceróis (TAGÉ do lípido é de pelo menos cerca de 70 %, e

xxiiÉ o lípido é essencialmente livre de colesterol. Num aspeto, o lípido compreende tri-DHA TAG (TAG 66:18É. Mais preferentemente, o lípido é essencialmente livre de SDA e ETA, e/ou não foi tratado com um processo de transesterificação depois de ser extraído a partir da parte da planta ou planta.

Também é descrito um processo para a produção de lípidos vegetais extraídos, compreendendo as etapas de

iÉ obter uma parte de planta compreendendo lípido, o lípido compreendendo ácidos gordos sob uma forma esterificada, os ácidos gordos compreendendo ácido oleico, ácido palmítico, ácidos gordos ω6 que compreendem ácido linoleico (LAÉ, ácidos gordos ω3 que compreendem ácido α-linolénico (ALAÉ e ácido docosahexaenoico (DHAÉ, e um ou mais de ácido estearidónico (SDAÉ, ácido eicosapentaenoico (EPAÉ, ácido docosapentaenoico (DPAÉ e ácido eicosatetraenoico (ETAÉ, em que (iÉ o nível de DHA no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 7 % e 20 %, (iiÉ o nível de ácido palmítico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 2 % e 16 %, (iiiÉ o nível de ácido mirístico (C14:0É no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que

6 %, (ivÉ o nível de ácido oleico no teor total de ácidos gordos do lípido extraído é entre 1 % e 30 % ou entre 30 % e 60 %, (vÉ o nível de ácido linoleico (LAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 4 % e 35 %, (viÉ o nível de ácido α-linolénico (ALAÉ, no teor de ácidos gordos do lípido extraído é entre 4 % e 40 %, (viiÉ o nível de ácido eicosatrienoico (ETrAÉ no teor total de ácido gordo do lípido extraído é menos do que 4 %, (viiiÉ o nível de ácidos gordos saturados totais no nível de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 4 % e 25 %, (ixÉ a razão de ácidos gordos ω6 totais:ácidos gordos ω3 totais no nível de ácidos gordos do lípido extraído é entre 1,0 e 3,0 ou entre 0,1 e 1, (xÉ o teor de triacilglicerol (TAGÉ do lípido é de pelo menos 70 % e (xiÉ pelo menos 70 % de DHA esterificado sob a forma de TAG está na posição *sn*-1 ou posição *sn*-3 do TAG.

iiÉ extrair lípido a partir da parte da planta,

em que o nível de DHA no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é de cerca de 7 % a 20 %.

Também é descrito um lípido, ou óleo compreendendo o lípido, produzido utilizando um processo da invenção.

Noutro aspeto, a presente invenção proporciona um processo para a produção de ésteres etílicos de ácidos gordos polinsaturados, o processo compreendendo a transesterificação de triacilgliceróis em lípido vegetal extraído, em que o lípido vegetal extraído compreende ácidos gordos esterificados sob a forma de triacilgliceróis, os ácidos gordos compreendendo ácido oleico, ácido palmítico, ácidos gordos ω6 que compreendem ácido linoleico (LAÉ, ácidos gordos ω3 que compreendem ácido linolénico (ALAÉ, e ácido docosahexaenoico (DHAÉ e, opcionalmente, um ou mais de ácido estearidónico (SDAÉ, ácido eicosapentaenoico (EPAÉ, ácido docosapentaenoico (DPAÉ e ácido eicosatetraenoico (ETAÉ, em que o nível de

DHA no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é de cerca de 7 % a 20 %, produzindo assim os ésteres etílicos e em que o nível de ácido palmítico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído está entre 2 % e 16 %, e em que o nível de ácido mirístico (C14:0É no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é inferior a 1 %, produzindo-se assim os ésteres etílicos.

Num aspeto preferido, o lípido extraído tem uma ou mais das características definidas acima.

Noutro aspeto, o presente pedido descreve um processo para a produção de ésteres etílicos de ácidos gordos polinsaturados, o processo compreendendo a transesterificação de triacilgliceróis em lípido vegetal extraído, em que o lípido vegetal extraído compreende ácidos gordos esterificados sob a forma de triacilgliceróis, os ácidos gordos compreendendo ácido oleico, ácido palmítico, ácidos gordos ω6 que compreendem o ácido linoleico (LAÉ, os ácidos gordos ω3 que compreendem um ácido linolénico (ALAÉ e ácido docosahexaenoico (DHAÉ, e um ou mais de ácido estearidónico (SDAÉ, ácido eicosapentaenoico (EPAÉ, ácido docosapentaenoico (DPAÉ e ácido eicosatetraenoico (ETAÉ, em que (iÉ o nível de DHA no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é de cerca de 3 %, cerca de 4 %, cerca de 5 %, cerca de 6 % ou entre 7 % e 20 %, (iiÉ o nível de ácido palmítico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 2 % e 16 %, (iiiÉ o nível de ácido mirístico (C14:0É no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que 6 %, (ivÉ o nível de ácido oleico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 1 % e 30 % ou entre 30 % e 60 %, (vÉ o nível de ácido linoleico (LAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 4 % e 35 %, (viÉ o nível de ácido α-linolénico (ALAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 4 % e 40 %, (viiÉ o nível de ácido eicosatrienoico (ETrAÉ no teor total de ácido

gordo do lípido extraído é menos do que 4 %, (viiiÉ o nível de ácidos gordos saturados totais no teor total de ácido gordo do lípido extraído é entre 4 % e 25 %, (ixÉ a razão de ácidos gordos ω6 totais:ácidos gordos ω3 totais no nível de ácidos gordos do lípido extraído é entre 1,0 e 3,0 ou entre 0,1 e 1, (xÉ o teor de triacilglicerol (TAGÉ do lípido é de pelo menos 70 %, e (xiÉ pelo menos 70 % de DHA esterificado sob a forma de TAG está na posição *sn*-1 ou posição sn-3 do TAG, produzindo, assim, ésteres de acetato. Num aspeto, o lípido vegetal extraído tem uma ou mais ou todas as seguintes características

iÉ o nível de ácido palmítico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 2 % e 15 %,

iiÉ o nível de ácido mirístico (C14:0É no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que 1 %,

iiiÉ o nível de ácido oleico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 3 % e cerca de 30 %, entre cerca de 6 % e cerca de 30 %, entre 1 % e cerca de 20 %, entre cerca de 45 % e cerca de 60 %, ou é de cerca de 30 %,

ivÉ o nível de ácido linoleico (LAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 4 % e cerca de 20 %, ou entre cerca de 4 % e 17 %,

vÉ o nível de ácido α-linolénico (ALAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 7 % e cerca de 40 %, entre cerca de 10 % e cerca de 35 %, entre cerca de 20 % e cerca de 35 %, ou entre cerca de 4 % e 16 %,

viÉ o nível de ácido γ-linolénico (GLAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que 4 %, menos do que cerca de 3 %, menos do que cerca de 2 %, menos do que cerca de 1 %, menos do que cerca de 0,5 %, entre 0,05 % e 7 %, entre 0,05 % e 4 %, ou entre 0,05 % e cerca de 3 %, ou entre 0,05 % e cerca de 2 %,

viiÉ o nível de ácido estearidónico (SDAÉ no teor de

ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que cerca de 4 %, menos do que cerca de 3 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 7 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 4 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 3 %, ou entre 0,05 % e cerca de 2 %,

viiiÉ o nível de ácido eicosatetraenoico (ETAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que cerca de 4 %, menos do que cerca de 1 %, menos do que cerca de 0,5 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 5 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 4 %, entre cerca de 0,05 % e cerca de 3 %, ou entre cerca de 0,05 % e cerca de 2 %,

ixÉ o nível de ácido eicosatrienoico (ETrAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que cerca de 2 %, menos do que cerca de 1 %, entre 0,05 % e 4 %, entre 0,05 % e 3 %, ou entre 0,05 % e cerca de 2 %, ou entre 0,05 % e cerca de 1 %,

xÉ o nível de ácido eicosapentaenoico (EPAÉ no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é menos do que 4 %, menos do que cerca de 3 %, menos do que cerca de 2 %, entre 0,05 % e 10 %, entre 0,05 % e 5 %, ou entre 0,05 % e cerca de 3 %, ou entre 0,05 % e cerca de 2 %,

xiÉ o nível de ácido docosapentaenoico (DPAÉ no teor total de ácido gordo do lípido extraído é menos do que 4 %, menos do que cerca de 3 %, menos do que cerca de 2 %, entre 0,05 % e 8 %, entre 0,05 % e 5 %, ou entre 0,05 % e cerca de 3 %, ou entre 0,05 % e cerca de 2 %,

xiiÉ o nível de DHA no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é de cerca de 8 %, cerca de 9 %, cerca de 10 %, cerca de 11 %, cerca de 12 %, cerca de 13 %, cerca de 14 %, cerca de 15 %, sobre 16 %, cerca de 17 %, cerca de 18 %, entre cerca de 8 % e 20 %, entre cerca de 10 % e 20 %, entre cerca de 11 % e 20 %, entre cerca de 10 % e cerca de 16 %, ou entre cerca de 14 % e 20 %,

xiiiÉ o lípido compreende ácido ω6-docosapentaenoico

(22:5$^{\Delta 4,7,10,13,16}$É no seu teor de ácidos gordos,
xivÉ o lípido é essencialmente livre de ácido ω6-docosapentaenoico (22:5$^{\Delta 4,7,10,13,16}$É no seu teor de ácidos gordos,
xvÉ o lípido é essencialmente livre de SDA, EPA e ETA no seu teor de ácidos gordos,
xviÉ o nível de ácidos gordos saturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 4 % e cerca de 20 %, ou entre cerca de 6 % e cerca de 20 %,
xviiÉ o nível de ácidos gordos monoinsaturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 4 % e cerca de 35 %, entre cerca de 8 % e cerca de 25 %, ou entre 8 % e cerca de 22 %,
xviiiÉ o nível de ácidos gordos polinsaturados totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 20 % e cerca de 75 %, entre cerca de 50 % e cerca de 75 %, ou entre cerca de 60 % e cerca de 75 %,
xixÉ o nível de ácidos gordos ω6 totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre cerca de 35 % e cerca de 50 %, entre cerca de 20 % e cerca de 35 %, entre cerca de 6 % e 20 %, menos do que 20 %, menos do que cerca de 16 %, menos do que cerca de 10 %, entre cerca de 1 % e cerca de 16 %, entre cerca de 2 % e cerca de 10 %, ou entre cerca de 4 % e cerca de 10 %,
xxÉ o nível de novos ácidos gordos ω6 no total de ácido gordo nível do lípido extraído é menos do que cerca de 10 %, menos do que cerca de 8 %, menos do que cerca de 6 %, menos do que 4 %, entre cerca de 1 % e cerca de 20 %, entre cerca de 1 % e cerca de 10 %, entre cerca de 0,5 % e cerca de 8 %, ou entre cerca de 0,5 % e 4 %,
xxiÉ o nível de ácidos gordos ω3 totais no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 36 % e cerca de 65 %, entre 40 % e cerca de 60 %, entre cerca de 20 % e cerca de 35 %, entre cerca de 10 % e cerca de 20 %, cerca

de 25 %, cerca de 30 %, cerca de 35 % ou cerca de 40 %,

xxiiÉ o nível de novos ácidos gordos ω3 no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é entre 9 % e cerca de 33 %, entre cerca de 10 % e cerca de 20 %, entre cerca de 20 % e cerca de 30 %, entre cerca de 12 % e cerca de 25 %, cerca de 13 %, cerca de 15 %, cerca de 17 % ou cerca de 20 %,

xxiiiÉ a razão de ácidos gordos totais ω6:ácidos gordos ω3 totais no teor de ácidos gordos do lípido extraído é entre cerca de 0,1 e cerca de 0,5, menos do que cerca de 0,50, menos do que cerca de 0,40, menos do que cerca de 0,30, menos do que cerca de 0,20, menos do que cerca de 0,15, cerca de 1,0, cerca de 0,1 ou cerca de 0,2,

xxivÉ a razão de novos ácidos gordos ω6:novos ácidos gordos ω3 no teor de ácidos gordos do lípido extraído é entre cerca de 1,0 e cerca de 3,0, entre cerca de 0,1 e cerca de 1, entre cerca de 0,1 e cerca de 0,5, menos do que cerca de 0,50, menos do que cerca de 0,40, menos do que cerca de 0,30, menos a cerca de 0,20, menos do que cerca de 0,15, cerca de 0,1, cerca de 0,2 ou cerca de 1,0,

xxvÉ a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se na eficiência de conversão de ácido oleico em DHA de pelo menos cerca de 10 %, pelo menos cerca de 15 %, pelo menos cerca de 20 %, entre cerca de 10 % e cerca de 50 %, entre cerca de 10 % e cerca de 30 %, ou entre cerca de 10 % e cerca de 25 %,

xxviÉ a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se numa eficiência de conversão de LA em DHA de pelo menos cerca de 15 %, pelo menos cerca de 20 %, pelo menos cerca de 22 %, pelo menos cerca de 25 %, entre cerca de 15 % e cerca de 50 %, entre cerca de 20 % e cerca de 40 %, ou entre cerca de 20 % e cerca de 30 %,

xxviiÉ a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se na eficiência de conversão de ALA em DHA de pelo menos

cerca de 17 %, pelo menos cerca de 22 %, pelo menos cerca de 24 %, entre cerca de 17 % e cerca de 55 %, entre cerca de 22 % e cerca de 35 %, ou entre cerca de 24 % e cerca de 35 %,

xxviiiÉ os ácidos gordos totais no lípido extraído têm menos de 1 % de C20:1,

xxixÉ o teor de triacilgliceróis (TAGÉ no lípido é de pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos 95 %, entre cerca de 70 % e cerca de 99 %, ou entre cerca de 90 % e cerca de 99 %,

xxxÉ o lípido compreende diacilglicerol (DAGÉ,

xxxiÉ o lípido compreende menos do que cerca de 10 %, menos do que cerca de 5 %, menos do que cerca de 1 %, ou entre cerca de 0,001 % e cerca de 5 %, ácidos gordos livres (não esterificadosÉ e/ou fosfolípidos, ou é essencialmente livre dos mesmos,

xxxiiÉ pelo menos 80 %, do DHA esterificado sob a forma de TAG está na posição *sn*-1 ou posição *sn*-3 do TAG,

xxxiiiÉ a espécie de TAG contendo DHA mais abundante no lípido é DHA/18:3/18:3 (TAG 58:12É, e

xxxivÉ o lípido compreende tri-DHA TAG (TAG 66:18É.

Com relação específica ao aspeto acima mencionado, num aspeto um ou mais ou todos dos seguintes se aplicam

iÉ o lípido está sob a forma de um óleo, em que o óleo compreende um ou mais de esteróis, como um ou mais ou todos de campesterol, Δ5-estigmasterol, eburicol, β-sitosterol, Δ5-avenasterol, Δ7-estigmasterol e Δ7-avenasterol e opcionalmente, o óleo compreende menos do que 10 mg de esteróis/g de óleo e/ou o óleo é essencialmente livre de colesterol,

iiÉ o lípido está sob a forma de um óleo a partir de uma semente oleaginosa, como semente oleaginosa é uma semente oleaginosa de *Brassica sp* ou de canola,

iiiÉ o nível de DHA no teor de ácidos gordos total do lípido vegetal extraído é de cerca de 3 %, cerca de 4 %,

cerca de 5 %, cerca de 6 %, ou seja entre 7 % e 20 %.

Num aspeto adicional, o presente pedido descreve uma construção genética quimérica compreendendo em ordem um primeiro gene, um segundo gene, um terceiro gene, um quarto gene, um quinto gene e um sexto gene que estão todos ligados de forma covalente numa única molécula de ADN,
em que os primeiro, segundo e terceiro genes estão unidos como um agrupamento de genes e o quarto, quinto e sexto genes estão unidos como um segundo agrupamento de genes,
em que cada gene compreende um promotor, uma região codificadora e um terminador da transcrição e/ou região de poliadenilação de tal modo que cada promotor está operativamente ligado à região codificadora e terminadora de transcrição e/ou à região de poliadenilação,
em que cada promotor é independentemente igual ou diferente dos outros promotores de modo que a molécula de ADN compreende três, quatro, cinco ou seis promotores diferentes,
em que um ou mais ou todos os promotores são heterólogos em relação à região codificadora à que estão operativamente ligados,
em que a direção da transcrição do primeiro gene é para longe do terceiro gene e oposta à direção de transcrição do terceiro gene,
em que a direção de transcrição do quarto gene é para longe do sexto gene e oposta à direção de transcrição do sexto gene,
em que a direção da transcrição do segundo gene é a mesma que para o primeiro gene ou o terceiro gene,
em que a direção da transcrição do quinto gene é a mesma que para o quarto gene ou o sexto gene,
em que a região terminadora de transcrição e/ou de poliadenilação do segundo gene está separado a partir do promotor do primeiro ou do terceiro gene, o que estiver mais próximo, por uma primeira região espaçadora de entre

cerca de 0,2 e cerca de 3,0 quilobases,
em que o primeiro agrupamento de genes está separado a partir do segundo agrupamento de genes por uma segunda região espaçadora de entre cerca de 1,0 e cerca de 10,0 quilobases, e
em que a região terminadora de transcrição e/ou de poliadenilação do quinto gene está separada a partir do promotor do quarto ou sexto gene, o que estiver mais próximo, por uma terceira região espaçadora de entre cerca de 0,2 e cerca de 3,0 quilobases.

Num aspeto, a molécula de ADN compreende um sétimo gene que está separado do primeiro agrupamento de genes ou do segundo agrupamento de genes, o que estiver mais próximo, por uma região espaçadora de entre cerca de 1,0 e cerca de 10,0 quilobases.

Noutro aspeto, a molécula de ADN compreende duas ou mais regiões diferentes de terminação da transcrição e/ou poliadenilação.

Ainda num aspeto adicional, pelo menos uma das regiões espaçadoras compreende uma região de ligação à matriz (MARÉ.

Num aspeto adicional, a molécula de ADN compreende as regiões de fronteira direita e esquerda que flanqueiam os genes e é uma molécula de T-ADN.

Noutro aspeto, a construção genética é uma célula *Agrobacterium* ou está integrada no genoma de uma célula vegetal.

Num aspeto preferido, pelo menos um dos genes codifica uma dessaturase de ácido gordo ou uma elongase de ácido gordo.

Noutro aspeto, a construção genética compreende genes que codificam um conjunto de enzimas como definido no presente documento, e/ou em que um ou mais dos genes codificam uma enzima, como definida no presente documento.

Num aspeto adicional, o presente pedido descreve um

polinucleótido isolado e/ou exógeno compreendendo:

iÉ uma sequência de nucleótidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 9, 11, 14, 18, 22, 23, 28, 34, 35, 39 ou 45, e/ou

iiÉ uma sequência de nucleótidos que é pelo menos 95 % idêntica ou 99 % idêntica a uma ou mais das sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 1 a 9, 11, 14, 18, 22, 23, 28, 34, 35, 39 ou 45.

Num aspeto particularmente preferido, o polinucleótido isolado e/ou exógeno compreende:

iÉ uma sequência de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, e/ou

iiÉ uma sequência de nucleótidos que é pelo menos 95 % idêntica ou 99 % idêntica à sequência estabelecida na SEQ ID NO: 2.

Noutro aspeto, o presente pedido descreve um vetor ou uma construção genética compreendendo o polinucleótido da invenção e/ou a construção genética da invenção.

Num aspeto, a sequência de nucleótidos selecionada a partir de qualquer uma das SEQ ID NOs: 11, 14, 18, 22, 23, 28, 34, 35, 39 ou 45, ou a sequência de nucleótidos que é pelo menos 95 % idêntica ou 99 % idêntica a uma ou mais das sequências estabelecidas em SEQ ID NOs: 11, 14, 18, 22, 23, 28, 34, 35, 39 ou 45, está operativamente ligada a um promotor.

Num aspeto adicional, a presente invenção proporciona uma célula hospedeira compreendendo polinucleótidos exógenos que codificam um dos seguintes conjuntos de enzimas;

iÉ uma ω3-dessaturase, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ6-elongase e uma Δ5-elongase,

iiÉ uma Δ15-dessaturase, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ6-elongase e uma Δ5-elongase,

iiiÉ uma Δ12-dessaturase, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-

dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ6-elongase e uma Δ5-elongase,

ivÉ uma Δ12-dessaturase, uma ω3-dessaturase ou uma Δ15-dessaturase, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ6-elongase e uma Δ5-elongase,

vÉ uma ω3-dessaturase, uma Δ8-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ9-elongase e uma Δ5-elongase,

viÉ uma Δ15-dessaturase, uma Δ8-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ9-elongase e uma Δ5-elongase,

viiÉ uma Δ12-dessaturase, uma Δ8-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ9-elongase e uma Δ5-elongase ou

viiiÉ uma Δ12-dessaturase, uma ω3-dessaturase ou uma Δ15-dessaturase, uma Δ8-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ9-elongase e uma Δ5-elongase,

e em que cada polinucleótido está operativamente ligado a um ou mais promotores que são capazes de direcionar a expressão dos ditos polinucleótidos na célula, e em que a célula compreende um lípido como definido na presente invenção.

Numa forma de realização, uma ou mais ou todas as dessaturases ou elongases têm uma ou mais das características como definidas acima.

Noutro aspeto, o presente pedido descreve uma célula hospedeira compreendendo

iÉ um primeiro polinucleótido exógeno que codifica uma Δ12-dessaturase, compreendendo aminoácidos que têm uma sequência como fornecida na SEQ ID NO: 10, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 50 % idêntica à SEQ ID NO: 10, e

iiÉ um segundo polinucleótido exógeno que codifica uma ω3-dessaturase compreendendo os aminoácidos tendo uma

sequência como fornecida na SEQ ID NO: 12, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 50 % idêntica à SEQ ID NO: 12,

em que cada polinucleótido está operativamente ligado a um ou mais promotores que são capazes de dirigir a expressão dos referidos polinucleótidos na célula.

Num aspeto adicional, o presente pedido descreve uma célula hospedeira compreendendo um ou mais do polinucleótidos da invenção, a construção genética da presente invenção, ou o vetor ou construção genética como descrita no presente pedido.

Numa forma de realização, a célula está numa planta, numa parte da planta e/ou é uma célula de semente madura da planta.

Numa forma de realização, a planta ou a semente de planta é uma planta oleaginosa, ou uma semente oleaginosa, respetivamente.

Também é fornecida uma planta transgénica compreendendo uma célula da invenção. Preferentemente, a planta é uma planta oleaginosa ou de *Arabidopsis thaliana*. Numa forma de realização, a planta é uma planta *Brassica*, preferentemente *B. napus* ou *B. juncea*, ou uma planta diferente de *Arabidopsis thaliana*.

Noutro aspeto, a presente invenção proporciona uma planta oleaginosa compreendendo

aÉ lípido na sua semente, o lípido compreendendo ácidos gordos sob uma forma esterificada, e

bÉ polinucleótidos exógenos que codificam um dos seguintes conjuntos de enzimas:

iÉ uma Δ12-dessaturase, uma ω3-dessaturase de fungos e/ou Δ15-dessaturase de fungos, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ6-elongase e uma Δ5-elongase, ou

iiÉ uma Δ12-dessaturase, uma ω3-dessaturase de fungos

e/ou Δ15-dessaturase de fungos, uma Δ8-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ9-elongase e uma Δ5-elongase,

em que cada polinucleótido está operativamente ligado a um ou mais promotores específicos de sementes que são capazes de direcionar a expressão do referido polinucleótidos na semente em desenvolvimento da planta, em que os ácidos gordos compreendem ácido oleico, ácido palmítico, ácidos gordos ω6 que compreendem o ácido linoleico (LAÉ e ácido γ-linolénico (GLAÉ, ácidos gordos ω3 que compreendem ácido α-linolénico (ALAÉ, ácido estearidónico (SDAÉ, ácido docosapentaenoico (DPAÉ e docosahexaenoico (DHAÉ, e opcionalmente ácido eicosapentaenoico (EPAÉ e/ou ácido eicosatetraenoico (ETAÉ, e em que o nível de DHA no teor de ácidos gordos total do lípido é de 7 % a 20 %, e em que o nível de ácido palmítico no teor de ácidos gordos total do lípido está entre 2 % e 16 %, e em que o nível de ácido mirístico (C14:0É no teor de ácidos gordos total do lípido é inferior a 1 %.

Exemplos de plantas oleaginosas incluem, entre outras, *Brassica sp.*, *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, *Helianthus* sp., *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Avena sativa*, *Trifolium* sp., *Elaesis guineenis*, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Camelina sativa*, ou *Crambe abyssinica*. Numa forma de realização, a planta oleaginosa é uma planta canola, *Glycine max*, *Camelina sativa* ou *Arabidopsis thaliana*. Numa forma de realização alternativa, a planta oleaginosa é diferente de *A. thaliana*.

Numa forma de realização, uma ou mais das dessaturases é capaz de utilizar um substrato de acil-CoA. Numa forma de realização preferida, uma ou mais de Δ6-dessaturase, Δ5-

dessaturase, Δ4-dessaturase e Δ8-dessaturase, se presente, é capaz de utilizar um substrato de acil-CoA, preferentemente cada uma de iÉ Δ6-dessaturase, Δ5-dessaturase e Δ4-dessaturase ou iiÉ Δ5-dessaturase, Δ4-dessaturase e Δ8-dessaturase é capaz de utilizar um substrato de acil-CoA. Numa forma de realização, uma Δ12-dessaturase e/ou uma ω3-dessaturase é capaz de utilizar um substrato de acil-CoA. O substrato de acil-CoA é preferentemente um ALA-CoA, ETA-CoA, DPA-CoA, ETrA-CoA, CoA-LA, GLA-CoA, ou ARA-CoA.

Numa forma de realização, a semente madura, colhida da planta tem um teor de DHA de pelo menos cerca de 28 mg por grama de semente, preferentemente pelo menos cerca de 32 mg por grama de semente, pelo menos, cerca de 36 mg por grama de semente, pelo menos, cerca de 40 mg por grama de semente, mais preferentemente pelo menos cerca de 44 mg por grama de sementes ou, pelo menos, cerca de 48 mg por grama de sementes. O nível máximo de DHA pode ser de cerca de 80 a cerca de 100 mg por grama de semente, ou cerca de 80 mg ou cerca de 100 mg por grama de sementes.

Num aspeto adicional, a presente invenção descreve uma planta *Brassica napus*, *B. juncea* ou *Camelina sativa* que é capaz de produzir sementes compreendendo DHA, em que a semente madura, colhida da planta tem um teor de DHA de pelo menos cerca de 28 mg por grama de semente, preferentemente pelo menos cerca de 32 mg por grama de semente, pelo menos, cerca de 36 mg por grama de semente, pelo menos cerca de 40 mg por grama de semente, mais preferentemente pelo menos cerca de 44 mg por grama de sementes ou, pelo menos, cerca de 48 mg por grama de sementes. O teor máximo de DHA pode ser de cerca de 80 a cerca de 100 mg por grama de semente, ou cerca de 80 mg ou cerca de 100 mg por grama de sementes.

Noutro aspeto, o presente pedido descreve uma célula vegetal de uma planta da invenção que compreende os

polinucleótidos exógenos.

Também é proporcionada uma parte da planta, preferentemente uma semente, que tem uma ou mais das seguintes características

iÉ é a partir de uma planta da invenção,

iiÉ compreende um lípido, como definido no presente documento,

iiiÉ pode ser utilizado num processo da invenção,

ivÉ compreende uma construção genética da presente invenção, ou

vÉ compreende um conjunto de polinucleótidos exógenos como definidos no presente documento.

Ainda noutro aspeto, o presente pedido descreve uma semente madura colhida de *Brassica napus*, *B. juncea* ou *Camelina sativa* compreendendo DHA e um teor de humidade entre cerca de 4 % e cerca de 15 % em peso, em que o teor de DHA da semente é de, pelo menos, cerca de 28 mg por grama de semente, preferentemente pelo menos cerca de 32 mg por grama de semente, pelo menos, cerca de 36 mg por grama de semente, pelo menos, cerca de 40 mg por grama de semente, mais preferentemente pelo menos cerca de 44 mg por grama de sementes ou, pelo menos, cerca de 48 mg por grama de sementes. O teor máximo de DHA pode ser de cerca de 80 a cerca de 100 mg por grama de semente, ou cerca de 80 mg ou cerca de 100 mg por grama de semente.

Numa forma de realização, a célula da invenção, a planta transgénica da invenção, a planta oleaginosa da invenção, a planta *Brassica napus*, *B. juncea* ou *Camelina sativa* da invenção, a parte da planta da invenção, ou a semente da invenção, que podem ser utilizadas para produzir lípido extraído compreendendo uma ou mais ou todas as características definidas no presente documento.

Ainda num aspeto adicional, o presente pedido descreve um método para a produção de uma célula da invenção, o método compreendendo

aÉ introduzir na célula, preferentemente uma célula que não é capaz de sintetizar um LC-PUFA, a construção génica da invenção, o polinucleótido isolado e/ou exógeno da invenção, o vetor ou construção genética da invenção, uma ou mais das combinações de polinucleótidos exógenos definidos no presente documento,

bÉ opcionalmente, expressar os genes ou polinucleótido(sÉ na célula;

cÉ opcionalmente, analisar a composição de ácidos gordos da célula, e

dÉ opcionalmente, selecionar uma célula que expressa os genes ou polinucleótido(sÉ.

Num aspeto, o lípido na célula tem uma ou mais das características definidas no presente documento.

Noutro aspeto, a construção génica, o polinucleótido isolado e/ou exógeno, o vetor, a construção genética ou combinações de polinucleótidos exógenos, tornam-se estavelmente integrados no genoma da célula.

Num aspeto adicional, a célula é uma célula vegetal, e o método compreende ainda a etapa de regeneração de uma planta transformada a partir da célula da etapa aÉ.

Noutro aspeto, os genes e/ou polinucleótido(sÉ exógenos são expressos transitoriamente na célula.

Também é descrita uma célula produzida usando um método da invenção.

Noutro aspeto, a presente invenção proporciona um método de produção de sementes, o método compreendendo,

aÉ cultivar uma planta da invenção, ou uma planta que produz uma parte como definida na invenção, preferentemente num campo como parte de uma população de pelo menos 1000 tais plantas ou numa área de pelo menos um hectare plantado com uma densidade de plantação padrão,

bÉ colher as sementes da planta ou plantas, e

cÉ opcionalmente, extrair lípido a partir da semente,

preferentemente, para produzir óleo com um rendimento total de DHA de pelo menos 60 kg de DHA/hectare.

Numa forma de realização, a planta, célula vegetal, parte da planta ou semente da invenção tem uma ou mais das seguintes características

iÉ o óleo é como definido no presente documento,

iiÉ a parte da planta ou semente é capaz de ser utilizada num processo da invenção,

iiiÉ os polinucleótidos exógenos estão compreendidos numa construção genética como descrita no presente documento,

ivÉ os polinucleótidos exógenos compreendem um polinucleótido exógeno como descrito no presente documento,

vÉ a célula vegetal é uma célula da invenção, e

viÉ a semente foi produzida de acordo com o método da invenção.

Noutro aspeto, o presente pedido descreve um método de produção de uma ou mais dessaturases de ácidos gordos e/ou elongases de ácidos gordos, ou uma ou mais dessaturases de ácidos gordos e um ou mais elongases de ácidos gordos, o método compreendendo a expressão numa célula ou sistema de expressão livre de células da construção genética, do polinucleótido isolado e/ou exógeno, do vetor ou da construção genética como descritos no presente documento, ou uma ou mais das combinações de polinucleótidos exógenos definidos no presente documento, preferentemente, numa semente oleaginosa em desenvolvimento numa planta oleaginosa no campo.

Num aspeto adicional, o presente pedido descreve um lípido, ou óleo, produzido por, ou obtido a partir de, utilizando o processo da invenção, a célula da invenção, a planta transgénica da invenção, a planta oleaginosa da invenção, a planta *Brassica napus*, *B. juncea* ou *Camelina sativa* da invenção, a parte da planta da invenção, a sementes da invenção, ou a planta, célula vegetal, parte da

planta ou semente da invenção.

Num aspeto, o lípido ou o óleo é obtido por extração de óleo a partir de uma semente oleaginosa. Exemplos de óleo de sementes oleaginosas incluem, entre outros, óleo de canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.É, óleo de mostarda (*Brassica junceaÉ*, óleo de outra *Brassica*, óleo de girassol (*Helianthus* annuusÉ, óleo de sementes de linho (*Linum usitatissimumÉ*, óleo de soja (*Glycine maxÉ*, o óleo de açafrão (*Carthamus tinctoriusÉ*, óleo de milho (*Zea maysÉ*, óleo de tabaco (*Nicotiana tabacumÉ*, óleo de amendoim (*Arachis hypogaeaÉ*, o óleo de palma, óleo de semente de algodão (*Gossypium hirsutumÉ*, óleo de coco (*Cocos nuciferaÉ*, óleo de abacate (*Persea americanaÉ*, azeite (*Olea europaeaÉ*, óleo de castanha de caju (*Anacardium occidentaleÉ*, óleo de macadâmia (*Macadamia intergrifoliaÉ*, óleo de amêndoas (*Prunus amygdalusÉ* ou óleo de semente de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thalianaÉ*.

Num aspeto adicional, o presente pedido descreve um ácido gordo produzido por, ou obtido a partir de, utilizando o processo da invenção, a célula da invenção, a planta transgénica da presente invenção, a planta oleaginosa da invenção, a planta *Brassica napus*, *B. juncea* ou *Camelina sativa* da invenção, a parte da planta da invenção, a semente da invenção, ou a planta, célula vegetal, parte da planta ou semente da invenção. Preferentemente, o ácido gordo é o DHA. O ácido gordo pode estar numa mistura de ácidos gordos que têm uma composição de ácidos gordos como descrito no presente documento. Num aspeto, o ácido gordo é não esterificado.

Também é fornecida farinha de semente obtida a partir de sementes da invenção. A farinha de semente preferida inclui, entre outras, farinha de semente de *Brassica napus*, *B. juncea*, *Camelina sativa* ou *Glycine max*. Numa forma de realização, a farinha de semente compreende um ou mais polinucleótidos exógenos e/ou construções genéticas como

definidos no presente documento.

Noutro aspeto, o presente pedido descreve uma composição compreendendo um ou mais de um lípido ou óleo da invenção, o ácido gordo, a construção genética, o polinucleótido isolado e/ou exógeno, o vetor ou construção genética como descritos no presente documento, a célula da invenção, a planta transgénica da invenção, a planta oleaginosa da invenção, a planta *Brassica napus*, *B. juncea* ou *Camelina sativa* da invenção, a parte da planta da invenção, a semente da invenção, a planta, célula vegetal, parte da planta ou semente da invenção, ou a farinha de semente da invenção. Em aspetos, a composição compreende um veículo adequado para utilização em alimentos, farmacêutica ou agrícola, um composto de tratamento de sementes, um fertilizante, um outro ingrediente alimentar ou de alimento para animais, ou proteínas ou vitaminas adicionadas.

Também são descritos produtos alimentares, cosméticos ou produtos químicos que compreendem um ou mais do lípido ou de óleo da invenção, o ácido gordo, a construção genética, o polinucleótido isolado e/ou exógeno, o vetor ou genética construção como descritos no presente documento, a célula da invenção, a planta transgénica da invenção, a planta oleaginosa da invenção, a planta *Brassica napus*, *B. juncea* ou *Camelina sativa* da invenção, a parte da planta da invenção, a semente da invenção, a planta, célula vegetal, parte da planta ou semente da invenção, a farinha de semente da invenção, ou a composição como descritos no presente documento.

Noutro aspeto, a presente invenção proporciona um método de produção de um ingrediente alimentar para consumo humano ou animal, compreendendo o método a mistura de um ou mais do lípido ou de óleo da invenção, da célula da invenção, da planta transgénica da presente invenção, da planta oleaginosa da invenção, da parte da planta da invenção ou da farinha de semente da invenção com pelo

menos um outro ingrediente alimentar.

Noutro aspeto, o presente pedido descreve um método de tratamento ou prevenção de uma condição que se beneficiaria de um PUFA, o método compreendendo a administração a um indivíduo de um ou mais do lípido ou de óleo da invenção, o ácido gordo, a construção genética, o polinucleótido isolado e/ou exógeno, o vetor ou construção genética como descritos no presente documento, a célula da invenção, a planta transgénica da invenção, a planta oleaginosa da invenção, a planta *Brassica napus*, *B. juncea* ou *Camelina sativa* da invenção, a parte da planta da invenção, as sementes da invenção, a planta, célula vegetal, parte da planta ou semente da invenção, a farinha de semente da invenção, a composição, ou a ração como descritos no presente documento.

Noutro aspeto, a presente invenção proporciona um ou mais dos lípidos ou óleo da invenção, a célula da invenção, a planta transgénica da invenção, a planta oleaginosa da invenção, a parte de planta da invenção ou a farinha de semente da invenção para utilização no tratamento ou prevenção de uma condição médica que se beneficiaria de um PUFA, em que a dita condição é arritmia cardíaca, angioplastia, inflamação, asma, psoríase, osteoporose, pedras nos rins, SIDA, esclerose múltipla, artrite reumatoide, doença de Crohn, esquizofrenia, cancro, síndrome alcoólica fetal, transtorno de hiperatividade e défice de atenção, fibrose cística, fenilcetonúria, depressão unipolar, hostilidade agressiva, adrenoleucodistrofia, doença cardíaca coronária, hipertensão, diabetes, obesidade, doença de Alzheimer, doença pulmonar obstrutiva crónica, colite ulcerativa, restenose após angioplastia, eczema, pressão arterial elevada, agregação plaquetária, hemorragia gastrointestinal, endometriose, síndrome pré-menstrual, encefalomielite miálgica, fadiga crónica após infeções

virais ou uma doença ocular.

Também é descrita a utilização de um ou mais do lípido ou do óleo da invenção, o ácido gordo, a construção genética, o polinucleótido isolado e/ou exógeno, o vetor ou construção genética como descritos no presente documento, a célula da invenção, a planta transgénica da presente invenção, a planta oleaginosa da invenção, a planta *Brassica napus*, *B. juncea* ou *Camelina sativa* da invenção, a parte da planta da invenção, as sementes da invenção, a planta, célula vegetal, parte da planta ou semente da invenção, a farinha de semente da invenção, a composição, ou o produto alimentar como descritos no presente documento para o fabrico de um medicamento para o tratamento ou prevenção de uma condição que se beneficiaria de um PUFA. A produção do medicamento pode compreender a mistura do óleo da invenção com um veículo farmaceuticamente aceitável, para o tratamento de uma condição como descrita no presente documento. O método pode compreender, em primeiro lugar purificar o óleo e/ou a transesterificação, e/ou fracionamento do óleo para aumentar o nível de DHA. Numa forma de realização particular, o método compreende o tratamento do lípido ou óleo como óleo de canola para converter os ácidos gordos no óleo em ésteres alquílicos, como ésteres metílicos ou etílicos. O tratamento adicional, como o fracionamento ou a destilação pode ser aplicado para enriquecer o lípido ou o óleo para o DHA. Num aspeto preferido, o medicamento compreende ésteres etílicos de DHA. Num aspeto ainda mais preferido, o nível de ésteres etílicos de DHA no medicamento é entre 30 % e 50 %. O medicamento pode ainda compreender ésteres etílicos de EPA, como entre 30 % e 50 % do teor total de ácidos gordos no medicamento. Tais medicamentos são adequados para administração a seres humanos ou animais para o tratamento de condições médicas como descrito no presente documento.

Noutro aspeto, o presente pedido descreve um método de

comercialização de sementes, compreendendo a obtenção de sementes da invenção, e comercialização da semente para ganhos pecuniários.

Num aspeto, a obtenção da semente compreende a cultura de plantas da presente invenção e/ou a colheita da semente a partir das plantas.

Noutro aspeto, a obtenção da sementes compreende adicionalmente a colocação da semente num recipiente e/ou o armazenamento da semente.

Num aspeto adicional, a obtenção da semente compreende ainda transportar a semente para uma localização diferente.

Ainda noutro aspeto, o método compreende adicionalmente o transporte de sementes para uma localização diferente depois da semente ser comercializada.

Num aspeto adicional, a comercialização é levada a cabo através de meios eletrónicos, como um computador.

Ainda num outro aspeto, o presente pedido descreve um processo de produção de silos de sementes compreendendo:

aÉ embrulhar, amontar e/ou colher partes das plantas acima do solo que compreendem sementes da invenção,

bÉ debulhar e/ou peneirar as partes das plantas para separar a semente do resto das partes da planta, e

cÉ peneirar e/ou classificar sementes separadas na etapa bÉ, carregar as sementes peneiradas e/ou classificadas em silos, produzindo assim silos de sementes.

Num aspeto, quando necessário, o lípido ou óleo, preferentemente óleo de semente de, ou útil para, a invenção tem níveis gordos próximos daqueles fornecidos num quadro na secção dos exemplos, como a semente 14 do quadro 16.

Qualquer forma de realização ou aspeto do presente documento devem ser interpretadas como aplicando-se, *mutatis mutandis*, a qualquer outra forma de realização ou aspeto, exceto quando indicado de outra forma.

A presente invenção não deve ser limitada quanto ao

âmbito pelas formas de realização específicas descritas no presente documento, que se destinam a ser apenas para o propósito de exemplificação. Produtos funcionalmente equivalentes, composições e métodos estão claramente dentro do âmbito da invenção, como descrito no presente documento.

Ao longo desta memória descritiva, a menos que especificamente indicado de outro modo ou que o contexto exija de outra forma, uma referência a uma única etapa, composição de matéria, grupo de etapas ou grupo de composições de matéria deve ser interpretada como abrangendo uma e uma pluralidade (isto é, uma ou maisÉ daquelas etapas, composições da matéria, grupos de etapas ou grupo de composições de matéria.

A invenção será doravante descrita por meio dos seguintes Exemplos não limitativos e com referência às figuras anexas.

BREVEÓDESCRIÇÃOÓDOSÓDESENHOSÓANEXOSÓ

FiguraÓ1. Vias de biossíntese aeróbica de DHA.

FiguraÓ2. Mapa da região de inserção do T-ADN entre as fronteiras esquerda e direita do pJP3416-GA7. RB indica a margem direita; LB fronteira esquerda; TER, região terminadora de transcrição/poliadenilação; PRO, promotor; Regiões de codificação são indicadas acima das setas, promotores e terminadores abaixo das setas. Micpu-Δ6D, *Micromonas pusilla* Δ6-dessaturase; Pyrco-Δ6E, *Pyramimonas cordata* Δ6-elongase; Pavsa-Δ5D, *Pavlova salina* Δ5-dessaturase; Picpa-ω3D, *Pichia pastoris* ω3-dessaturase; Pavsa-Δ4D, *P. salina* Δ4-dessaturase; Lack1-Δ12D, *Lachancea kluyveri* Δ12-dessaturase; Pyrco-Δ5E, *Pyramimonas cordata* Δ5-elongase. NOS indica a região terminador da transcrição/poliadenilação de nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*; FP1, promotor truncado napina de *Brassica napus*; FAE1, promotor FAE1 de *Arabidopsis thaliana*; Lectina, região terminadora da transcrição/poliadenilação de lectina de *Glycine max*;

Cnl1 e Cnl2 denota promotor ou terminador de conlinina1 ou conlinina2 de *Linum usitatissimum*. MAR indica a região de ligação da matriz Rb7 de *Nicotiana tabacum*.

FiguraÓ3. Mapa da região de inserção do T-ADN entre as fronteiras esquerda e direita do pJP3404. Os marcadores são como na Figura 2.

FiguraÓ4. Mapa da região de inserção entre as fronteiras esquerda e direita do pJP3367. Os marcadores são como na Figura 2.

FiguraÓ5. Os níveis de DHA em percentagem do total de ácidos gordos no lípido de múltiplas sementes *Arabidopsis thaliana* transgénicas, independentes, tanto nas gerações T_2 e T_3. Os eventos T_2 entre colchetes foram levados para T_3. Eventos de ambos os fundos de mutantes de Columbia e fad2 de *A. thaliana* são mostrados.

FiguraÓ6. Teor de óleo (p/p) frente a teor de DHA, como uma percentagem do teor de ácidos gordos total de lípido a partir de sementes transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

FiguraÓ7. RT-PCR em gel representativos mostrando a baixa expressão do gene Δ6-dessaturase em relação aos outros transgenes no T-ADN de embriões *B. napus* transformados usando pJP3416-GA7. As pistas da esquerda mostram produtos de RT-PCR: 1, marcadores de tamanho de ADN; pista 2, Δ12-dessaturase; pista 3, ω3-dessaturase; pista 4, Δ6-dessaturase (baixa expressão); pista 5, Δ6-elongase; pista 6, Δ5-dessaturase; pista 7, Δ5-elongase; pista 8, Δ4-dessaturase.

FiguraÓ8. Percentagem de ALA traçada contra a percentagem de ácido oleico, cada uma como uma percentagem do total de ácidos gordos no lípido obtido de embriões somáticos transgénicos de 35S:LEC2 de *Brassica napus*.

FiguraÓ9. A análise da distribuição posicional por RMN em A) óleo de atum e, B) óleo de semente de *Arabidopsis* DHA transgénica. Os picos marcados como "DHA-alfa"

representam a quantidade DHA presente nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do TAG (sem preferência posicional esta seria igual a 66 % de DHA totalÉ, enquanto os picos marcados como "DHA-beta" representam a quantidade de DHA presente na posição *sn*-2 de TAG (sem preferência este seria igual a 33 % de DHAÉ.

FiguraÓ 10. A análise LC-MS das principais espécies de triacilglicerol contendo DHA em sementes em desenvolvimento (cinzentoÉ e maduras (pretoÉ transgénicas de *A. thaliana*. O número depois de DHA indica o número total de átomos de carbono, o número total de ligações duplas nos outros dois ácidos gordos. Portanto DHA/34:1, também pode ser designado TAG 56:7, etc.

FiguraÓ11. Mapa da região de inserção do T-ADN entre as fronteiras esquerda e direita do pORE04+11ABGBEC_Cowpea_EPA_insert. Os marcadores são como na Figura 2; SSU, promotor da subunidade pequena rubisco *de Arabidopsis thaliana*.

FiguraÓ 12. Mapa do vetor binário pJP3364 que mostra o sítio de restrição *Not*I onde as Δ12-dessaturases candidatas foram clonadas.

FiguraÓ13. BoxPlot gerado utilizando SigmaPlot mostrando a percentagem de ácidos gordos 20:4ω6 (ARAÉ no lípido de semente de populações de sementes T2 de *Arabidopsis* transformadas com pFN045-pFN050. O limite de cada caixa mais próximo de zero indica o percentil 25, uma linha dentro de cada caixa marca a mediana e os limites de cada caixa mais distante de zero indica o percentil 75. As barras de erro mostradas acima e abaixo de cada caixa indicam os percentis 90 e 10.

FiguraÓ 14. Nível médio de ARA como uma percentagem do teor total de ácidos gordos no lípido da semente de sementes T2 de *Arabidopsis* transformadas com pFN045-pFN050.

FiguraÓ 15. BoxPlot mostrando a percentagem de ácidos

gordos 20:2ω6 (EDAÉ no lípido de semente de populações de sementes T2 de *Arabidopsis* transformadas com pFN045-pFN050. O BoxPlot representa valores como descritos na Figura 13.

FiguraÓ 16. BoxPlot mostrando a percentagem de ARA em lípidos de sementes de populações de sementes T4 de *Arabidopsis* transformadas com pFN045-pFN050. O BoxPlot representa valores como descrito na Figura 13.

FiguraÓ 17. Nível médio de ARA como uma percentagem do teor total de ácidos gordos no lípido de semente de populações de sementes T4 de *Arabidopsis* transformadas com pFN045-pFN050.

FiguraÓ 18. BoxPlot mostrando a percentagem de EDA em lípidos de sementes de populações de sementes T4 de *Arabidopsis* transformadas com pFN045-pFN050. O BoxPlot representa valores como descrito na Figura 13.

FiguraÓ 19. (AÉ estrutura básica de fitoesterol com a numeração do anel e de cadeia lateral. (BÉ Estruturas químicas de alguns dos fitosteróis.

FiguraÓ20. Árvore filogenética de LPAATs conhecidos.

FiguraÓ 21.Ó As várias enzimas de troca de acilo que transferem ácidos gordos entre PC, agrupamentos de CoA e agrupamentos de TAG. Adaptado de Singh *et al.* (2005É.

LEGENDAÓPARAÓAÓLISTAÓDEÓSEQUÊNCIAÓ

SEQ ID NO: 1- sequência de nucleótidos de pJP3416-GA7.

SEQ ID NO: 2 - sequência de nucleótidos de pGA7-mod_B.

SEQ ID NO: 3 - sequência de nucleótidos de pGA7-mod_C.

SEQ ID NO: 4 - sequência de nucleótidos de pGA7-mod_D.

SEQ ID NO: 5 - sequência de nucleótidos de pGA7-mod_E.

SEQ ID NO: 6 - sequência de nucleótidos de pGA7-mod_F.

SEQ ID NO: 7 - sequência de nucleótidos de pGA7-mod_G.

SEQ ID NO: 8 - sequência de nucleótidos de pORE04+11ABGBEC_Cowpea_EPA_insert.

SEQ ID NO: 9 - grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de Δ12-dessaturase de *Lachancea*

kluyveri em plantas.
SEQ ID NO: 10 - Δ12-dessaturase de *Lachancea kluyveri*.
SEQ ID NO: 11 - grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de ω3 dessaturase de *Pichia pastoris* em plantas.
SEQ ID NO: 12 - ω3 dessaturase de *Pichia pastoris*.
SEQ ID NO: 13 - grelha de leitura aberta que codifica Δ6-dessaturase de *Micromonas pusilla*.
SEQ ID NO: 14 - grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de Δ6-dessaturase de *Micromonas pusilla* em plantas (versão 1É.
SEQ ID NO: 15 - grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de Δ6-dessaturase de *Micromonas pusilla* em plantas (versão 2É.
SEQ ID NO: 16 - Δ6-dessaturase de *Micromonas pusilla*.
SEQ ID NO: 17 - grelha de leitura aberta que codifica Δ6-dessaturase de *Ostreococcus lucimarinus*.
SEQ ID NO: 18 - grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de Δ6-dessaturase de *Ostreococcus lucimarinus* em plantas.
SEQ ID NO: 19 - Δ6-dessaturase de *Ostreococcus lucimarinus*.
SEQ ID NO: 20 - Δ6-dessaturase de *Ostreococcus tauri*.
SEQ ID NO: 21 - grelha de leitura aberta que codifica para Δ6-elongase de *Pyramimonas cordata*.
SEQ ID NO: 22 - grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de Δ6-elongase de *Pyramimonas cordata* em plantas (truncada na extremidade 3′ e que codifica elongase funcionalÉ (versão 1É.
SEQ ID NO: 23 - grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de Δ6-elongase de *Pyramimonas cordata* em plantas (truncada na extremidade 3′ e que codifica elongase funcionalÉ (versão 2É.
SEQ ID NO: 24 - grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de Δ6-elongase de *Pyramimonas*

cordata em plantas (truncada na extremidade 3' e que codifica elongase funcionalÉ (versão 3É.

SEQ ID NO: 25 - Δ6-elongase de *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO: 26 - Δ6-elongase de *Pyramimonas cordata* truncada.

SEQ ID NO: 27 - Grelha de leitura aberta que codifica para Δ5-dessaturase de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO: 28 - grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de Δ5-dessaturase de *Pavlova salina* em plantas (versão 1É.

SEQ ID NO: 29 - grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de Δ5-dessaturase de *Pavlova salina* em plantas (versão 2É.

SEQ ID NO: 30 - Δ5-dessaturase de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO: 31 - grelha de leitura aberta que codifica para Δ5-dessaturase de *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO: 32 - Δ5-dessaturase de *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO: 33 - Grelha de leitura aberta que codifica para Δ5-elongase de *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO: 34 - grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de Δ5-elongase de *Pyramimonas cordata* em plantas (versão 1É.

SEQ ID NO: 35 - grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de Δ5-elongase de *Pyramimonas cordata* em plantas (versão 2É.

SEQ ID NO: 36 - grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de Δ5-elongase de *Pyramimonas cordata* em plantas (versão 3É.

SEQ ID NO: 37 - Δ5-elongase de *Pyramimonas cordata*.

SEQ ID NO: 38 - Grelha de leitura aberta que codifica para Δ4-dessaturase de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO: 39 - grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de Δ4-dessaturase de *Pavlova salina* em plantas (versão 1É.

SEQ ID NO: 40 - grelha de leitura aberta otimizada por

codões para a expressão de Δ4-dessaturase de *Pavlova salina* em plantas (versão 2É.

SEQ ID NO: 41 - Δ4-dessaturase de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO: 42 - grelha de leitura aberta que codifica Δ9-elongase de *Isochrysis galbana*.

SEQ ID NO: 43 - Δ9-elongase de *Isochrysis galbana*.

SEQ ID NO: 44 - Grelha de leitura aberta que codifica para Δ9-elongase de *Emiliania huxleyi* CCMP1516.

SEQ ID NO: 45 - grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de Δ9-elongase de *Emiliania huxleyi* em plantas.

SEQ ID NO 46 - Δ9-elongase de *Emiliania huxleyi CCMP1516*.

SEQ ID NO 47 - Grelha de leitura aberta que codifica para Δ9-elongase de *Pavlova pinguis*.

SEQ ID NO 48 - Δ9-elongase de *Pavlova pinguis*.

SEQ ID NO 49 - Grelha de leitura aberta que codifica para Δ9-elongase de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO 50 - Δ9-elongase de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO 51 - Grelha de leitura aberta que codifica para Δ8-dessaturase de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO 52 - Δ8-dessaturase de *Pavlova salina*.

SEQ ID NO 53 - supressor viral P19.

SEQ ID NO 54 - supressor viral V2.

SEQ ID NO 55 - supressor viral P38.

SEQ ID NO 56 - supressor viral Pe-P0.

SEQ ID NO 57 - supressor viral RPV-P0 .

SEQ ID NO 58 - Grelha de leitura aberta que codifica para supressor viral P19.

SEQ ID NO 59 - Grelha de leitura aberta que codifica para supressor viral V2.

SEQ ID NO 60 - Grelha de leitura aberta que codifica para supressor viral P38.

SEQ ID NO 61 - Abrir codificação quadro de leitura supressor viral Pe-P0.

SEQ ID NO 62 - Grelha de leitura aberta que codifica para

supressor viral RPV-P0.

SEQ ID NO 63 - LPAAT2 de *Arabidopsis thaliana*.

SEQ ID NO 64 - LPAAT de *Limnanthes alba*.

SEQ ID NO 65 - LPAAT de *Saccharomyces cerevisiae*.

SEQ ID NO 66 - LPAAT de *Micromonas pusilla*.

SEQ ID NO 67 - LPAAT de *Mortierella alpina*.

SEQ ID NO 68 - LPAAT de *Brassisa napus*.

SEQ ID NO 69 - LPAAT de *Brassica napus*.

SEQ ID NO 70 - ω3 dessaturase de *Phytophthora infestans*.

SEQ ID NO 71 - ω3 dessaturase de *Thalassiosira pseudonana*.

SEQ ID NO 72 - ω3 dessaturase de *Pythium irregulare*.

DESCRIÇÃOÓDETALHADAÓDAÓINVENÇÃOÓ

Técnicas gerais e definições

A menos que especificamente definido de outra forma, devem ser interpretados todos os termos técnicos e científicos utilizados no presente documento como tendo o mesmo significado que o normalmente entendido por um perito na especialidade (por exemplo, em cultura de células, genética molecular, síntese de ácidos gordos, plantas transgénicas, química de proteínas e bioquímicaÉ.

A menos que indicado de outra forma, a proteína recombinante, a cultura de células, e técnicas imunológicas utilizadas na presente invenção são procedimentos padrão, bem conhecidos pelos peritos na especialidade. Tais técnicas são descritas e explicadas em toda a literatura em fontes como, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984É, J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning:. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989É, T.A. Brown (editorÉ, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 e 2, IRL Press (1991É, D.M. Glover e B.D. Hames (editoresÉ, ADN Cloning: a practical approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 e 1996É, F.M. Ausubel *et al.* (editoresÉ, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub.

Associates e Wiley-Interscience (1988, incluindo todas as atualizações até o presenteÉ, Ed Harlow e David Lane (editoresÉ, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Spring, (1988É, e J.E. Coligan *et al.* (editoresÉ, Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (incluindo todas as atualizações até o presenteÉ.

O termo "e/ou", por exemplo, "X e/ou Y" deve ser entendido como qualquer um "X e Y" ou "X ou Y" e devem ser tomadas para fornecer suporte explícito para ambos os significados ou para qualquer significado.

Como utilizado no presente documento, o termo "cerca de", a menos que indicado em contrário, refere-se a +/- 10 %, mais preferentemente de +/- 5 %, mais preferentemente de +/- 1 % do valor designado.

Ao longo desta memória descritiva, a palavra "compreendem", ou variações como "compreende" ou "compreendendo", serão entendidas como implicando a inclusão de um elemento, número inteiro ou etapa, ou grupo de elementos, números inteiros ou etapas declarados, mas não a exclusão de qualquer outro elemento, número inteiro ou etapa, ou grupo de elementos, números inteiros ou etapas.

Definições selecionadas

Como utilizados no presente documento, os termos "lípido vegetal extraído" e "lípido vegetal isolado" referem-se a uma composição de lípidos que foi extraída a partir de, por exemplo, por trituração, uma planta ou parte da mesma, como da semente. O lípido extraído pode ser uma composição relativamente em bruto obtida, por exemplo, esmagando uma semente de planta, ou uma composição mais purificada onde a maioria, se não a totalidade, de um ou mais ou todos de água, ácidos nucleicos, proteínas e hidratos de carbono derivados do material da planta foi removida. Exemplos de métodos de purificação são descritos abaixo. Numa forma de realização, o lípido vegetal extraído

ou isolado compreende pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 90 %, ou pelo menos cerca de 95 % (p/pÉ de lípidos em peso, da composição. O lípido pode ser sólido ou líquido à temperatura ambiente, quando líquido é considerado como sendo um óleo. Numa forma de realização, o lípido extraído da invenção não foi misturado com outro lípido, como o DHA não produzido por outra fonte (por exemplo, DHA a partir do óleo de peixeÉ. Numa forma de realização, após a extração a razão de um ou mais ou todos, de ácido oleico para DHA, ácido palmítico para DHA, ácido linoleico para DHA, e os ácidos gordos totais ω6:ácidos gordos totais ω3, não foi significativamente alterada (por exemplo, não mais do que uma alteração de 10 % ou 5 %É quando comparado com a razão na semente ou célula intacta. Noutra forma de realização, o lípido vegetal extraído não foi exposto a um procedimento, como hidrogenação ou fracionamento, que pode alterar a razão de um ou mais ou todos, de ácido oleico para DHA, ácido palmítico para DHA, ácido linoleico para DHA, e ácidos gordos totais ω6:ácidos gordos totais ω3, quando em comparação com a razão na semente intacta ou célula. Quando o lípido vegetal extraído da invenção está compreendido num óleo, o óleo pode compreender adicionalmente moléculas não de ácidos gordos como os esteróis.

Como utilizados no presente documento, os termos "óleo vegetal extraído" e "óleo vegetal isolado" referem-se a uma substância ou composição compreendendo lípido vegetal extraído ou lípido vegetal isolado e que é um líquido à temperatura ambiente. O óleo é obtido a partir de uma planta ou parte da mesma, como uma semente. O óleo extraído ou isolado pode ser uma composição relativamente em bruto obtida, por exemplo, esmagando uma semente de planta, ou uma composição mais purificada onde a maioria, se não a totalidade, de um ou mais ou todos de água, ácidos nucleicos, proteínas e hidratos de carbono derivados do

material vegetal foram removidos. A composição pode compreender outros componentes que podem ser lipídicos ou não lipídicos. Numa forma de realização, a composição de óleo compreende pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 90 %, ou pelo menos cerca de 95 % (p/pÉ de lípidos extraídos da planta. Numa forma de realização, o óleo extraído da invenção não foi misturado com outro óleo, como o DHA não produzido por outra fonte (por exemplo, DHA a partir do óleo de peixeÉ. Numa forma de realização, após a extração, a razão de um ou mais ou todos, de ácido oleico para DHA, ácido palmítico para DHA, ácido linoleico para DHA, e os ácidos gordos totais ω6:ácidos gordos totais ω3, não foi significativamente alterada (por exemplo, não maior do que uma alteração de 10 % ou 5 %É quando comparada com a razão na semente intacta ou célula. Noutra forma de realização, o óleo vegetal extraído não foi exposto a um procedimento, como hidrogenação ou fracionamento, que podem alterar a razão de um ou mais ou todos, de ácido oleico para DHA, ácido palmítico para DHA, ácido linoleico para DHA, e ácidos gordos totais ω6: ácidos gordos totais ω3, quando em comparação com a proporção na semente intacta ou célula. O óleo vegetal extraído da invenção pode compreender moléculas não de ácidos gordos, como os esteróis.

Como utilizado no presente documento, um "óleo" é uma composição compreendendo predominantemente lípido e que é um líquido à temperatura ambiente. Por exemplo, o óleo da invenção compreende preferentemente pelo menos 75 %, pelo menos 80 %, pelo menos 85 % ou pelo menos 90 % em peso de lípidos. Tipicamente, um óleo purificado compreende pelo menos 90 % de triacilgliceróis (TAGÉ, em peso do lípido no óleo. Componentes menores de um óleo, como diacilgliceróis (DAGÉ, ácidos gordos livres (FFAÉ, e esteróis de fosfolípidos podem estar presentes como descrito no

presente documento.

Como utilizado no presente documento, o termo "ácido gordo" refere-se a um ácido carboxílico (ou ácido orgânicoÉ, muitas vezes com uma cauda longa alifática, saturada ou insaturada. Tipicamente, os ácidos gordos têm uma cadeia ligada carbono-carbono de pelo menos 8 átomos de carbono de comprimento, mais preferentemente, pelo menos, 12 carbonos de comprimento. A maioria dos ácidos gordos de ocorrência natural têm um número par de átomos de carbono porque a sua biossíntese envolve acetato que tem dois átomos de carbono. Os ácidos gordos podem estar num estado livre (não esterificadosÉ ou numa forma esterificada, como parte de um triglicérido, diacilglicérido, monoacilglicérido, acil-CoA (tio-ésterÉ ligados ou outra forma ligada. O ácido gordo pode ser esterificado como um fosfolípido, como uma fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol ou formas de difosfatidilglicerol.

"Ácidos gordos saturados" não contêm quaisquer ligações duplas ou outros grupos funcionais ao longo da cadeia. O termo "saturado" refere-se ao hidrogénio, em que todos os átomos de carbono (além do grupo ácido carboxílico [-COOH]É contêm tantos átomos de hidrogénio quanto possíveis. Por outras palavras, a extremidade (ωÉ ómega 3 contém hidrogénios (CH3-É e cada carbono na cadeia contém dois átomos de hidrogénio (-CH2-É.

"Os ácidos gordos insaturados" são de forma semelhante aos ácidos gordos saturados, exceto que os grupos funcionais de um ou mais alqueno existem ao longo da cadeia, com cada alqueno substituindo uma parte isoladamente ligada "-CH2-CH2-" da cadeia com uma fração de ligação dupla "-CH = CH-" (ou seja, um carbono ligado por ligação dupla a outro carbonoÉ. Os próximos dois átomos de carbono na cadeia que são ligados a ambos os lados da

ligação dupla podem ocorrer numa configuração *cis* ou *trans*.

Como utilizado no presente documento, o termo "ácido gordo monoinsaturado" refere-se a um ácido gordo compreendendo pelo menos 12 átomos de carbono na sua cadeia de carbono e apenas um grupo alqueno (ligação duplas carbono-carbonoÉ na cadeia. Como utilizado no presente documento, os termos "ácido gordo polinsaturado" ou "PUFA" referem-se a um ácido gordo compreendendo pelo menos 12 átomos de carbono na sua cadeia de carbono e, pelo menos, dois grupos alqueno (ligações duplas carbono-carbonoÉ.

Como utilizado no presente documento, os termos "ácido gordo polinsaturado de cadeia longa" e "LC-PUFA" referem-se a um ácido gordo compreendendo pelo menos 20 átomos de carbono na sua cadeia de carbono e pelo menos duas ligações duplas carbono-carbono, e, portanto, incluem VLC-PUFAs. Como utilizado no presente documento, os termos "ácido gordo de cadeia muito longa polinsaturados" e "VLC-PUFA" referem-se a um ácido gordo compreendendo pelo menos 22 átomos de carbono na sua cadeia de carbono e pelo menos três ligações duplas carbono-carbono. Normalmente, o número de átomos de carbono na cadeia de carbono dos ácidos gordos refere-se a uma cadeia de carbono não ramificada. Se a cadeia de carbono é ramificada, o número de átomos de carbono exclui aqueles nos grupos laterais. Numa forma de realização, o ácido gordo polinsaturado de cadeia longa é um ácido gordo ω3, isto é, tendo uma insaturação (ligação dupla carbono-carbonoÉ na terceira ligação carbono-carbono a partir da extremidade metilo do ácido gordo. Noutra forma de realização, o ácido gordo polinsaturado de cadeia longa é um ácido gordo ω6, isto é, tendo uma insaturação (ligação dupla carbono-carbonoÉ na sexta ligação carbono-carbono a partir da extremidade metilo do ácido gordo. Noutra forma de realização, o ácido gordo polinsaturado de cadeia longa é selecionado do grupo que consiste em ácido araquidónico (ARA, 20:4Δ5,8,11,14; ω6É, ácido eicosatetraenoico (ETA,

20:4Δ8,11,14,17, ω3É, ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5Δ5,8,11,14,17; ω3É, ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5Δ7,10,13,16,19, ω3É ou ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6Δ4,7,10,13,16,19, ω3É. O LC-PUFA pode também ser o ácido di-homo-ɣ-linoleico (DGLAÉ ou ácido eicosatrienoico (ETrA, 20:3Δ11,14,17, ω3É. Seria prontamente aparente que o LC-PUFA que é produzido de acordo com a invenção pode ser uma mistura de qualquer ou de todos os anteriores e pode incluir outros LC-PUFA ou derivados de qualquer um destes LC-PUFA. Numa forma de realização preferida, os ácidos gordos ω3 são, pelo menos, DHA, preferentemente, DPA e DHA, ou EPA, DPA e DHA.

Além disso, como utilizados no presente documento, os termos "ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa" e "ácido gordo polinsaturado de cadeia muita longa" referem-se ao ácido gordo num estado livre (não esterificadoÉ ou numa forma esterificada como parte de um triglicérido, diacilglicérido, monoacilglicérido, acil-CoA ligado a outra forma ligada. O ácido gordo pode ser esterificado como um fosfolípido, como uma fosfatidilcolina (PCÉ, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol ou formas difosfatidilglicerol. Assim, o LC-PUFA pode estar presente como uma mistura de formas no lípido de uma célula ou um óleo purificado ou lípido extraído de células, tecidos ou organismos. Em formas de realização preferenciais, a invenção fornece óleo que compreende, pelo menos, 75 % ou, pelo menos, 85 % de triacilgliceróis, com o restante presente como outras formas de lípido, como aquelas mencionadas, com pelo menos os referidos triacilgliceróis compreendendo o LC-PUFA. O óleo pode, subsequentemente, ser ainda mais purificado ou tratado, por exemplo, por hidrólise com uma base forte, para libertar os ácidos gordos livres, ou por destilação ou semelhantes.

Como utilizado no presente documento, "ácidos gordos

ω6 totais" ou "teor de ácidos gordos ω6 totais" ou semelhante refere-se à soma de todos os ácidos gordos ω6, esterificados e não esterificados, no lípido extraído, óleo, célula recombinante, parte de planta ou sementes, conforme determine o contexto, expresso como uma percentagem do teor total de ácidos gordos. Estes ácidos gordos ω6 incluem (se presentesÉ LA, GLA, DGLA, ARA, EDA e ω6-DPA, e excluem quaisquer ácidos gordos ω3 e ácidos gordos monoinsaturados.

Como utilizado no presente documento, "novos ácidos gordos ω6" ou "teor de novos ácidos gordo ω6" ou semelhante refere-se à soma de todos os ácidos gordos ω6 excluindo LA, esterificados e não esterificados, no lípido extraído, óleo, célula recombinante, parte da planta ou semente, conforme determine o contexto, expresso como uma percentagem do teor total de ácidos gordos. Estes novos ácidos gordos ω6 são os ácidos gordos que são produzidos nas células, plantas, partes de plantas e sementes da presente invenção através da expressão das construções genéticas (polinucleótidos exógenosÉ introduzidas nas células, e incluem (se presenteÉ GLA, DGLA, ARA, EDA e ω6-DPA, mas excluem LA e ácidos gordos ω3 e ácidos gordos monoinsaturados. Teores de ácidos gordos totais ω6 exemplificativos e novos teores de ácidos gordos ω6 são determinados por conversão de ácidos gordos numa amostra em FAME e análise por GC, como descrito no Exemplo 1.

Como utilizado no presente documento, "ácidos gordos ω3 totais" (ou "teor de ácidos gordos ω3 totais" ou semelhante referem-se à soma de todos os ácidos gordos ω3, esterificados e não esterificados, no lípido extraído, óleo, célula recombinante, parte de planta ou sementes, conforme determine o contexto, expresso como uma percentagem do conteúdo total de ácidos gordos. Estes ácidos gordos ω3 incluem (se presentesÉ ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA e DHA, e excluem quaisquer ácidos gordos ω6 e

ácidos gordos monoinsaturados.

Como utilizado no presente documento, "novos ácidos gordos ω3" ou "teor de novos ácidos gordos ω3" ou semelhante referem-se à soma de todos os ácidos gordos ω3 excluindo ALA, esterificados e não esterificados, no lípido extraído, óleo, célula recombinante, parte da planta ou semente, conforme determine o contexto, expresso como uma percentagem do teor total de ácidos gordos. Estes novos ácidos gordos ω3 são os ácidos gordos que são produzidos nas células, plantas, partes de plantas e sementes da presente invenção através da expressão das construções genéticas (polinucleótidos exógenosÉ introduzidos nas células, e incluem (se presentesÉ SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA e DHA, mas excluem ALA e qualquer ácido gordo ω6 e ácido gordo monoinsaturado. Os teores de ácidos gordos ω3 totais exemplares e teores de novos ácidos gordos ω3 são determinados pela conversão dos ácidos gordos numa amostra em FAME e análise por GC, como descrito no Exemplo 1.

As proteínas dessaturase, elongase e acil transferase e os genes que as codificam que podem ser utilizados na presente invenção são quaisquer dos conhecidos na técnica ou homólogos ou seus derivados. Exemplos de tais genes e tamanhos de proteínas codificadas estão listados no Quadro 1. As enzimas dessaturases que foram mostradas para participar na biossíntese de LC-PUFA pertencem todas ao grupo das denominadas dessaturases "*front-end*".

Como utilizado no presente documento, o termo "dessaturase *front-end*" refere-se a um membro de uma classe de enzimas que introduz uma ligação dupla entre o grupo carboxilo e uma parte insaturada pré-existente da cadeia de acilo dos lípidos, que são caracterizados estruturalmente pela presença de um domínio de citocromo b5 N-terminal, juntamente com um domínio de dessaturase de ácido gordo típico que inclui três caixas de histidina altamente conservadas (Napier *et al.*, 1997É.

A atividade de qualquer das elongases ou dessaturases para utilização na invenção pode ser testada através da expressão de um gene que codifica a enzima de uma célula como, por exemplo, uma célula de levedura, uma célula vegetal ou, preferentemente, em embriões somáticos ou das plantas transgénicas, e determinação de se a célula, embrião ou uma planta tem uma maior capacidade produção de LC-PUFA em comparação com uma célula, embrião ou uma planta comparável onde a enzima não é expressa.

Numa forma de realização uma ou mais das dessaturases e/ou elongases para utilização na invenção podem ser purificadas a partir de uma microalga, ou seja, são idênticas na sequência de aminoácidos de um polipéptido que pode ser purificado a partir de uma microalga.

Enquanto certas enzimas são especificamente descritas no presente documento como "bifuncionais", a ausência de dito termo não implica necessariamente que uma determinada enzima não possua uma atividade diferente da especificamente definida.

Dessaturases

Como utilizado no presente documento, o termo "dessaturase" refere-se a uma enzima que é capaz de introduzir uma ligação dupla carbono-carbono em que o grupo acilo de um substrato de ácido gordo que é tipicamente em uma forma esterificada, como, por exemplo, ésteres de acil-CoA. O grupo acilo pode ser esterificado com um fosfolípido, como fosfatidilcolina (PCÉ, ou com a proteína transportadora de acilo (ACPÉ, ou numa forma de realização preferida com CoA. As dessaturases podem, no geral, ser categorizadas em três grupos consequentemente. Numa forma de realização, a dessaturase é uma dessaturase *front-end*.

Como utilizado no presente documento, uma "Δ4-dessaturase" refere-se a uma proteína que desempenha uma reação de dessaturação que introduz uma ligação dupla carbono-carbono na posição da 4ª ligação carbono-carbono a

partir da extremidade carboxilo de um substrato de ácido gordo. A "Δ4-dessaturase" é, no mínimo, capaz de converter DPA em DHA. A etapa de dessaturação para produzir DHA a partir de DPA é catalisada por uma Δ4-dessaturase em organismos além de mamíferos, e um gene que codifica esta enzima foi isolado a partir das espécies de protistas de água doce *Euglena gracilis* e espécies marinhas *Thraustochytrium* sp. (Qiu *et al*, 2001; Meyer *et al*, 2003É. Numa forma de realização, a Δ4-dessaturase compreende os aminoácidos tendo uma sequência como fornecida na SEQ ID NO: 41, ou uma Δ4-dessaturase de *Thraustochytrium* sp., ou um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80 % idêntica à SEQ ID NO: 41.

QuadroÓ1. Genes clonados envolvidos na biossíntese de LC-PUFA

Enzima	**TipoÓdeÓ organismo**	**Espécie**	**N.°sÓdeÓ acesso**	**TamanhoÓ daÓ proteína (aa)**	**Referências**
Δ4-dessaturase	Protista	*Euglena gracilis*	AY278558	541	Meyer *et al.*, 2003
	Algas	*Pavlova lutherii*	AY332747	445	Tonon *et al.*, 2003
		Isochrysis galbana	AAV33631	433	Pereira *et al.*, 2004b
		Pavlova salina	AAY15136	447	Zhou *et al.*, 2007

	Traustoquitrídeo	*Thraustochytrium aureum*	AAN75707 AAN75708 AAN75709 AAN75710	515	N/A
		Thraustochytrium sp. ATCC21685	AAM09688	519	Qiu *et al.* 2001
Δ5-dessaturase	Mamíferos	*Homo sapiens*	AF199596	444	Cho *et al.*, 1999b Leonard *et al.*, 2000b
	Nematode	*Caenorhabditis elegans*	AF11440, NM_069350	447	Michaelson *et al.*, 1998b; Watts and Browse, 1999b
	Fungos	*Mortierella alpina*	AF067654	446	Michaelson *et al.*, 1998a; Knutzon *et al.*, 1998
		Pythium irregulare	AF419297	456	Hong *et al.*, 2002a
		Dictyostelium discoideum	AB022097	467	Saito *et al.*, 2000
		Saprolegnia diclina		470	WO02081668

	Diatomácea	*Phaeodactylum tricornutum*	AY082392	469	Domergue *et al.*, 2002
	Algas	*Thraustochytrium sp*	AF489588	439	Qiu *et al.*, 2001
		Thraustochytrium aureum		439	WO02081668
		Isochrysis galbana		442	WO02081668
	Musgo	*Marchantia polymorpha*	AY583465	484	Kajikawa *et al.*, 2004
Δ6-dessaturase	Mamíferos	*Homo sapiens*	NM_013402	444	Cho *et al.*, 1999a; Leonard *et al.*, 2000
		Mus musculus	NM 019699	444	Cho *et al.*, 1999a
	Plantas	*Borago officinales*	U79010	448	Sayanova *et al.*, 1997
		Echium	AY055117 AY055118		Garcia-Maroto *et al.*, 2002

		Primula vialii	AY234127	453	Sayanova *et al.*, 2003
		Anemone leveillei	AF536525	446	Whitney *et al.*, 2003
	Musgos	*Ceratodon purpureus*	AJ250735	520	Sperling *et al.*, 2000
		Marchantia polymorpha	AY583463	481	Kajikawa *et al.*, 2004
		Physcomitrella patens	CAA11033	525	Girke *et al.*, 1998
	Fungos	*Mortierella alpina*	AF110510 AB020032	457	Huang *et al.*, 1999; Sakuradani *et al.*, 1999
		Pythium irregulare	AF419296	459	Hong *et al.*, 2002a
		Mucor circinelloides	AB052086	467	NCBI*
		Rhizopus sp.	AY320288	458	Zhang *et al.*, 2004
		Saprolegnia diclina		453	WO02081668
	Diatomácea	*Phaeodactylum tricornutum*	AY082393	477	Domergue *et al.*, 2002

	Bactéria	*Synechocystis*	L11421	359	Reddy *et al.*, 1993
	Alga	*Thraustochytrium aureum*		456	WO02081668
Δ5/Δ6-dessaturase bifuncional	Peixe	*Danio rerio*	AF309556	444	Hastings *et al.*, 2001
C20 Δ8-dessaturase	Alga	*Euglena gracilis*	AF139720	419	Wallis and Browse, 1999
	Plantas	*Borago officinales*	AAG43277	446	Sperling *et al.*, 2001
Δ6-elongase	Nematode	Caenorhabditis elegans	NM_069288	288	Beaudoin *et al.*, 2000
	Musgos	*Physcomitrella patens*	AF428243	290	Zank *et al.*, 2002
		Marchantia polymorpha	AY583464	290	Kajikawa *et al.*, 2004
	Fungos	*Mortierella alpina*	AF206662	318	Parker-Barnes *et al.*, 2000
	Algas	*Pavlova lutheri***		501	WO 03078639

		*Thraustochytrium sp***	AX214454	271	WO 0159128
PUFA-elongase	Mamíferos	*Homo sapiens*	AF231981	299	Leonard *et al.*, 2000b; Leonard *et al.*, 2002
		Rattus norvegicus	AB071985	299	Inagaki *et al.*, 2002
		*Rattus norvegicus***	AB071986	267	Inagaki *et al.*, 2002
		Mus musculus	AF170907	279	Tvrdik *et al.*, 2000
		Mus musculus	AF170908	292	Tvrdik *et al.*, 2000
	Peixes	*Danio rerio*	AF532782	291 (282É	Agaba *et al.*, 2004
		*Danio rerio***	NM 199532	266	Lo *et al.*, 2003
	Minhoca	*Caenorhabditis elegans*	Z68749	309	Abbott *et al.*, 1998 Beaudoin *et al.*, 2000
	Algas	*Thraustochytrium aureum***	AX464802	272	WO 0208401-A2
		*Pavlova lutheri***		320	WO 03078639

Δ9-elongase	Algas	*Isochrysis galbana*	AF390174	263	Qi *et al.*, 2002
		Euglena gracilis		258	WO 08/128241
Δ5-elongase	Algas	*Ostreococcus tauri*	AAV67798	300	Meyer *et al.*, 2004
		Pyramimonas cordata		268	WO 2010/057246
		Pavlova sp. CCMP459	AAV33630	277	Pereira *et al.*, 2004b
		Pavlova salina	AAY15135	302	Robert *et al.*, 2009
	Diatomácea	*Thalassiosira pseudonana*	AAV67800	358	Meyer *et al.*, 2004
	Peixe	*Oncorhynchus mykiss*	CAM55862	295	WO 06/008099
	Musgo	*Marchantia polymorpha*	BAE71129	348	Kajikawa *et al.*, 2006
* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ ** Função não provada/não demonstrada					

Como utilizado no presente documento, uma "Δ5-dessaturase" refere-se a uma proteína que desempenha uma reação de dessaturação que introduz uma ligação dupla carbono-carbono na posição da 5ª ligação carbono-carbono a partir da extremidade carboxilo de um substrato de ácido gordo. Exemplos de Δ5-dessaturases estão listados em Ruiz-Lopez *et al.*, (2012É e Petrie *et al.*, (2010aÉ e no Quadro 1

do presente documento. Numa forma de realização, a Δ5-dessaturase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 30, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80 % idêntica à SEQ ID NO: 30. Noutra forma de realização, a Δ5-dessaturase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 32, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 53 % idêntica à SEQ ID NO: 32. Noutra forma de realização, a Δ5-dessaturase é de *Thraustochytrium* sp ou *Emiliania huxleyi*.

Como utilizado no presente documento, uma "Δ6-dessaturase" refere-se a uma proteína que desempenha uma reação de dessaturação que introduz uma ligação dupla carbono-carbono na 6ª ligação carbono-carbono a partir da extremidade carboxilo de um substrato de ácido gordo. Exemplos de Δ6-dessaturases estão listados em Ruiz-Lopez *et al.*, (2012É e Petrie *et al.*, (2010aÉ e no Quadro 1 no presente documento. Δ6-dessaturases preferenciais são de *Micromonas pusilla*, *Pythium irregulare* ou *Ostreococcus taurii*.

Numa forma de realização, a Δ6-dessaturase é ainda caracterizada por ter pelo menos duas, preferentemente todas as três, e preferentemente numa célula vegetal, das seguintes: iÉ uma maior atividade de Δ6-dessaturase sobre ácido α-linolénico (ALA, 18:3Δ9, 12,15, ω3É do que sobre ácido linoleico (LA, 18:2Δ9,12, ω6É como substrato de ácidos gordos; iiÉ maior atividade de Δ6-dessaturase sobre ALA-CoA como substrato de ácidos gordos do que sobre ALA unido na posição *sn*-2 de PC como substrato de ácidos gordos e iiiÉ atividade de Δ8-dessaturase sobre ETrA. Exemplos de tais Δ6-dessaturases são fornecidos no Quadro 2.

Numa forma de realização a Δ6-dessaturase tem maior atividade num substrato de ω3 do que num substrato correspondente de ω6 e tem atividade sobre ALA para

produzir ácido octadecatetraenoico (ácido estearidónico, SDA, 18:4Δ6,9,12,15, ω3É com uma eficiência de pelo menos 30 %, mais preferentemente pelo menos 40 %, ou mais preferentemente pelo menos 50 % quando expressa a partir de um polinucleótido exógeno numa célula recombinante, como uma célula vegetal, ou, pelo menos, 35 % quando expressa numa célula de levedura. Numa forma de realização, a Δ6-dessaturase tem uma maior atividade, por exemplo, pelo menos cerca de 2 vezes maior atividade de Δ6-dessaturase, sobre ALA do que sobre LA como substrato de ácidos gordos. Noutra forma de realização, a Δ6-dessaturase tem uma maior atividade, por exemplo, pelo menos cerca de 5 vezes maior atividade de Δ6-dessaturase ou, pelo menos, 10 vezes maior atividade, sobre ALA-CoA como substrato de ácidos gordos do que sobre ALA unido na posição *sn*-2 de PC como substrato de ácidos gordos. Noutra forma de realização, a Δ6-dessaturase tem atividade em ambos os substratos de ácidos gordos ALA-CoA e ALA unidos na posição *sn*-2 de PC.

QuadroÓ2. Dessaturases demonstradas como tendo atividade sobre um substrato de acil-CoA

Enzima	TipoÓdeÓ organismo	Espécie	N.°sÓdeÓ acesso	TamanhoÓdaÓ proteínaÓ (aa)	Referências
Δ6-dessaturase	Algas	*Mantoniella squamata*	CAQ30479	449	Hoffmann *et al.*, 2008
		Ostreococcus tauri	AAW70159	456	Domergue *et al.*, 2005
		Micromonas pusilla	EEH58637		Petrie *et al.*, 2010a (SEQ ID NO: 13É

Δ5-dessaturase	Algas	*Mantoniella squamata*	CAQ30478	482	Hoffmann *et al.*, 2008
	Plantas	*Anemone leveillei*	N/A		Sayanova *et al.*, 2007
ω3-dessaturase	Fungos	*Pythium aphanidermatum*	FW362186.1	359	Xue *et al.*, 2012; WO2008/054565
	Fungos (oomycetesÉ	*Phytophthora sojae*	FW362214.1	363	Xue *et al.*, 2012; WO2008/054565
	Fungos (oomycetesÉ	*Phytophthora ramorum*	FW362213.1	361	Xue *et al.*, 2012; WO2008/054565

Numa forma de realização, a Δ6-dessaturase não tem qualquer atividade de Δ5-dessaturase detetável sobre ETA. Noutra forma de realização, a Δ6-dessaturase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 ou SEQ ID NO: 20, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 77 % idêntica à SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 ou SEQ ID NO: 20. Noutra forma de realização, a Δ6-dessaturase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 19 ou SEQ ID NO: 20, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 67 % idêntica a uma ou ambas de SEQ ID NO: 19 ou SEQ ID NO: 20. A Δ6-dessaturase também pode ter atividade de Δ8-dessaturase.

Como utilizado no presente documento, uma "Δ8-dessaturase" refere-se a uma proteína que desempenha uma reação de dessaturação que introduz uma ligação dupla

carbono-carbono na posição da 8ª ligação carbono-carbono a partir da extremidade carboxilo de um substrato de ácidos gordos. A Δ8-dessaturase é, pelo menos, capaz de converter ETrA em ETA. Exemplos de Δ8-dessaturases são listados no Quadro 1. Numa forma de realização, a Δ8-dessaturase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 52, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80 % idêntica à SEQ ID NO: 52.

Como utilizado no presente documento, uma "ω3-dessaturase" refere-se a uma proteína que realiza uma reação de dessaturação que introduz uma ligação dupla carbono-carbono na terceira ligação carbono-carbono a partir da extremidade metilo de um substrato de ácidos gordos. A ω3-dessaturase, portanto, pode converter LA em ALA e GLA em SDA (todos ácidos gordos C18É, ou DGLA em ETA e/ou ARA em EPA (ácidos gordos C20É. Algumas ω3-dessaturases (grupo IÉ têm atividade somente em substratos C18, como ω3-dessaturases de plantas e cianobactérias. Tal ω3-dessaturases também são Δ15-dessaturases. Outras ω3-dessaturases têm atividade em substratos C20 sem qualquer atividade (grupo IIÉ ou alguma atividade (grupo IIIÉ em substratos C18. Tais ω3-dessaturases são também Δ17-dessaturases. ω3-dessaturases preferenciais são grupo de tipo III que convertem LA em ALA, GLA em SDA, DGLA em ETA e ARA em EPA, como a ω3-dessaturase de *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 12É. Exemplos de ω3-dessaturases, incluem as descritas por Pereira *et al.* (2004aÉ (ω3-dessaturase de *Saprolegnia diclina*, grupo IIÉ, Horiguchi *et al.* (1998É, Berberich *et al.* (1998É e Spychalla *et al.* (1997É (ω3-dessaturase de *C. elegans*, grupo IIIÉ. Numa forma de realização preferencial, a ω3-dessaturase é uma ω3-dessaturase de fungos. Como utilizado no presente documento, uma "ω3-dessaturase de fungos" refere-se a uma ω3-dessaturase que é proveniente de uma fonte fúngica,

incluindo uma fonte de oomycetes, ou uma variante da mesma cuja sequência de aminoácidos é pelo menos 95 % idêntica à mesma. Os genes que codificam várias ω3-dessaturases foram isolados a partir de fontes fúngicas, como, por exemplo, a partir de *Phytophthora infestans* (N.° de acesso CAJ30870, WO2005083053; SEQ ID NO: 70É, *Saprolegnia diclina* (N.° de acesso AAR20444, Pereira *et al.*, 2004a e Patente US N.° 7211656É, *Pythium irregulare* (WO2008022963, Grupo II; SEQ ID NO: 72É, *Mortierella alpina* (Sakuradani et al, 2005;. N.° de acesso BAD91495; WO2006019192É, *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust et al, 2004; N.° de acesso XP_002291057; WO2005012316, SEQ ID NO.: 71É, *Lachancea kluyveri* (também conhecido como *Saccharomyces kluyveri*; Oura et al, 2004; N.° de acesso AB 118663É. Xue *et al.* (2012É descreve ω3-dessaturases dos oomycetes *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora sojae* e *Phytophthora ramorum* que foram capazes de converter eficientemente substratos de ácidos gordos ω6 nos ácidos gordos ω3 correspondentes, com uma preferência para os substratos de C20, isto é, tiveram atividade de Δ17-dessaturase mais forte do que a atividade de Δ15-dessaturase. Estas enzimas são desprovidas da atividade de Δ12-dessaturase, mas podem utilizar ácidos gordos em ambos acil-CoA e fração fosfolipídica, como substratos.

Numa forma de realização mais preferencial, a ω3-dessaturase fúngica é a ω3-dessaturase/Δ15-dessaturase de *Pichia pastoris* (também conhecida como *Komagataella pastoris*É (Zhang *et al.*, 2008; N.° de acesso EF116884; SEQ ID NO.: 12É, ou um polipéptido que é pelo menos 95 % idêntico a estas.

Numa forma de realização, a ω3-dessaturase é pelo menos capaz de converter um de ARA em EPA, DGLA em ETA, GLA em SDA, ambos ARA em EPA e DGLA em ETA, ambos ARA em EPA e SDA em GLA, ou todos os três destes.

Numa forma de realização, a ω3-dessaturase tem

atividade Δ17-dessaturase em um ácido gordo C20 que tem pelo menos três ligações duplas carbono-carbono, preferentemente ARA. Noutra forma de realização, a ω3-dessaturase tem atividade Δ15-dessaturase em um ácido gordo C18 que tem três ligações duplas carbono-carbono, preferentemente GLA. Preferentemente, ambas as atividades estão presentes.

Como utilizado no presente documento, uma "Δ12-dessaturase" refere-se a uma proteína que desempenha uma reação de dessaturação que introduz uma ligação dupla carbono-carbono na 12ª ligação carbono-carbono a partir da extremidade carboxilo de um substrato de ácido gordo. Δ12-dessaturases tipicamente convertem oleoil-fosfatidilcolina ou oleoil-CoA para linoleoil-fosfatidilcolina (18:1-PCÉ ou linoleoil-CoA (18:1-CoAÉ, respetivamente. A subclasse utilizando o substrato ligado a PC são referidas como Δ12-dessaturases dependentes de fosfolípidos, a última subclasse como Δ12-dessaturases dependentes de acil-CoA. Δ12-dessaturases de plantas e fungos são geralmente das últimas subclasses, enquanto Δ12-dessaturases de animais são da última subclasse, por exemplo, as Δ12-dessaturases codificadas por genes clonados a partir de insetos por Zhou *et al.* (2008É. Muitas outras sequências de Δ12-dessaturase podem ser facilmente identificadas através de pesquisa em bases de dados de sequências.

Como utilizado no presente documento, uma "Δ15-dessaturase" refere-se a uma proteína que desempenha uma reação de dessaturação que introduz uma ligação dupla carbono-carbono na 15ª ligação carbono-carbono a partir da extremidade carboxilo de um substrato de ácidos gordos. Numerosos genes que codificam Δ15-dessaturases foram clonados a partir de espécies de plantas e fungos. Por exemplo, o documento US5952544 descreve ácidos nucleicos que codificam Δ15-dessaturases de plantas (FAD3É. Estas enzimas compreendem motivos de aminoácidos que eram

característicos das Δ15-dessaturases de plantas. O documento WO200114538 descreve um gene que codifica FAD3 de soja. Muitas outras sequências de Δ15-dessaturase podem ser facilmente identificadas através de pesquisa em bases de dados de sequências.

Como utilizado no presente documento, uma "Δ17-dessaturase" refere-se a uma proteína que desempenha uma reação de dessaturação que introduz uma ligação dupla carbono-carbono na 17ª ligação carbono-carbono a partir da extremidade carboxilo de um substrato de ácido gordo. Uma Δ17-dessaturase é também considerada como uma ω3-dessaturase se atua sobre um substrato de C20 para introduzir uma dessaturação na ligação ω3.

Numa forma de realização preferencial, a Δ12-dessaturase e/ou Δ15-dessaturase é uma Δ12-dessaturase de fungos ou Δ15-dessaturase de fungos. Como utilizado no presente documento, uma "Δ12-dessaturase de fungos" ou "uma Δ15-dessaturase de fungos" refere-se a uma Δ12-dessaturase ou Δ15-dessaturase, que é proveniente de uma fonte fúngica, incluindo uma fonte de oomycetes, ou uma sua variante, cuja sequência de aminoácidos é pelo menos 95 % idêntica à mesma. Os genes que codificam as numerosas dessaturases foram isolados a partir de fontes fúngicas. O documento US 7211656 descreve um Δ12-dessaturase de *Saprolegnia diclina*. O documento WO2009016202 descreve dessaturases de fungos *Helobdella robusta*, *Laccaria bicolor*, *Lottia gigantea*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Monosiga brevicollis*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycospaerella graminicola*, *Naegleria Gruben*, *Nectria haematococca*, *Nematostella vectensis*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Trichoderma resii*, *Physcomitrella patens*, *Postia placenta*, *Selaginella moellendorffii* e *Microdochium nivale*. O documento WO2005/012316 descreve uma Δ12-dessaturase de *Thalassiosira pseudonana* e outros fungos. O documento WO2003/099216 descreve genes que codificam Δ12-dessaturases e Δ15-

dessaturases de fungos a partir de isolados de *Neurospora crassa*, de *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea* e *Mortierella alpina*. O documento WO2007133425 descreve Δ15 dessaturases de fungos isoladas a partir de: *Saccharomyces kluyveri*, *Mortierella alpina*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme* e *Magnaporthe grisea*. Uma Δ12-dessaturase preferencial é de *Phytophthora sojae* (Ruiz-Lopez *et al.*, 2012É.

Uma subclasse distinta de Δ12-dessaturases de fungos, e Δ15-dessaturases de fungos, são as A12/Δ15-dessaturases bifuncionais de fungos. Os genes que codificam estas foram clonados a partir de *Fusarium monoliforme* (N.° de acesso DQ272516, Damude *et al.*, 2006É, *Acanthamoeba castellanii* (N.° de acesso EF017656, Sayanova *et al.*, 2006É, *Perkinsus marinus* (WO2007042510É, *Claviceps purpurea* (N° de Acessão. EF536898, Meesapyodsuk *et al.*, 2007É e *Coprinus cinereus* (N.° de acesso AF269266, Zhang *et al.*, 2007É.

Noutra forma de realização, a ω3-dessaturase tem, pelo menos, alguma atividade sobre, preferentemente, maior atividade sobre, um substrato de acil-CoA do que num substrato correspondente de acil-PC. Como utilizado no presente documento, um "substrato de acil-PC correspondente" refere-se ao ácido gordo esterificado na posição *sn*-2 de fosfatidilcolina (PCÉ, onde o ácido gordo é o mesmo ácido gordo como no substrato de acil-CoA. Por exemplo, o substrato de acil-CoA pode ser ARA-CoA e o substrato correspondente de acil-PC é *sn*-2 ARA-PC. Numa forma de realização, a atividade é, pelo menos, duas vezes maior. Preferentemente, a ω3-dessaturase tem, pelo menos, alguma atividade sobre ambos um substrato de acil-CoA e o seu substrato correspondente de acil-PC e tem atividade sobre ambos os substratos C18 e C20. Exemplos de tais ω3-dessaturases são conhecidos entre as dessaturases de fungos clonadas listadas acima.

Noutra forma de realização, a ω3-dessaturase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 12, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 60 % idêntica à SEQ ID NO: 12, preferentemente pelo menos 90 % ou pelo menos 95 % idêntica à SEQ ID NO: 12.

Ainda noutra forma de realização, uma dessaturase para utilização na presente invenção tem maior atividade num substrato de acil-CoA do que sobre um substrato correspondente de acil-PC. Noutra forma de realização, uma dessaturase para utilização na presente invenção tem maior atividade sobre um substrato de acil-PC do que sobre um substrato correspondente de acil-CoA, mas tem alguma atividade sobre ambos os substratos. Como descrito acima, um "substrato de acil-PC correspondente" refere-se ao ácido gordo esterificado na posição *sn*-2 de fosfatidilcolina (PCÉ, onde o ácido gordo é o mesmo ácido gordo como no substrato de acil-CoA. Numa forma de realização, a maior atividade é, pelo menos, duas vezes maior. Numa forma de realização, a dessaturase é uma Δ5 ou Δ6-dessaturase, ou uma ω3-dessaturase, exemplos das quais são fornecidos, mas não limitados aos listados, no Quadro 2. Para testar que um substrato de dessaturase atua, nomeadamente, sobre uma acil-CoA redutase ou um substrato de acil-PC, os ensaios podem ser realizados em células de levedura como descrito em Domergue, *et al.* (2003É e (2005É. A capacidade do substrato de acil-CoA para uma dessaturase também pode ser inferido quando uma elongase, quando expressa em conjunto com a dessaturase, tem uma eficiência de conversão enzimática em células vegetais de, pelo menos, cerca de 90 %, onde a elongase catalisa o alongamento do produto da dessaturase. Nesta base, a Δ5-dessaturase e Δ4-dessaturases expressas a partir da construção GA7 (Exemplos 2 e 3É e variantes das mesmas (Exemplo 5É é capaz de dessaturar os seus respetivos substratos de acil-CoA, ETA-CoA e DPA-CoA.

Elongases

A evidência bioquímica sugere que o alongamento do ácido gordo consiste em quatro etapas: condensação, redução, desidratação e uma segunda redução. No contexto desta invenção, uma "elongase" refere-se ao polipéptido que catalisa a etapa de condensação na presença dos outros membros do complexo de alongamento, sob condições fisiológicas adequadas. Tem sido demonstrado que a expressão heteróloga ou homóloga em uma célula de apenas o componente de condensação ("elongase"É do complexo de proteína de alongamento é necessário para o alongamento da respetiva cadeia acilo. Assim, a elongase introduzida é capaz de recrutar com sucesso as atividades de redução e de desidratação a partir do hospedeiro transgénico para realizar alongamentos de acilo bem-sucedidos. A especificidade da reação de alongamento em relação ao comprimento da cadeia e o grau de dessaturação de substratos de ácidos gordos parece residir no componente de condensação. Também se acredita que este componente é limitante da velocidade na reação de alongamento.

Como utilizado no presente documento, uma "Δ5-elongase" é, pelo menos, capaz de converter EPA em DPA. Exemplos de Δ5-elongases incluem aqueles divulgados no documento WO2005/103253. Numa forma de realização, a Δ5-elongase tem atividade sobre EPA para produzir DPA com uma eficiência de pelo menos 60 %, mais preferentemente pelo menos 65 %, mais preferentemente pelo menos 70 % ou mais, preferentemente pelo menos 80 % ou 90 %. Noutra forma de realização, a Δ5-elongase compreende uma sequência de aminoácidos como fornecida na SEQ ID NO: 37, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 47 % idêntica à SEQ ID NO: 37. Noutra forma de realização, a Δ6-elongase é de *Ostreococcus taurii* ou *Ostreococcus lucimarinus* (US2010/088776É.

Como utilizado no presente documento, uma "Δ6-

elongase" é, pelo menos, capaz de converter SDA em ETA. Exemplos de Δ6-elongases incluem os listados no Quadro 1. Numa forma de realização, a elongase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 25, um fragmento biologicamente ativo (como o fragmento fornecido como SEQ ID NO: 26É, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 55 % idêntica a uma ou ambas de SEQ ID NO: 25 ou SEQ ID NO: 26. Numa forma de realização, a Δ6-elongase é de *Physcomitrella patens* (Zank et al, 2002;. N.° de acesso AF428243É ou *Thalassiosira pseudonana* (Ruiz-Lopez *et al*, 2012É.

Como utilizado no presente documento, uma "Δ9-elongase" é, pelo menos, capaz de converter ETrA em ALA. Exemplos de Δ9-elongases incluem os listados no Quadro 1. Numa forma de realização, a Δ9-elongase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 43, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 80 % idêntica à SEQ ID NO: 43. Noutra forma de realização, a Δ9-elongase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 46, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 81 % idêntica à SEQ ID NO: 46. Noutra forma de realização, a Δ9-elongase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 48, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 50 % idêntica à SEQ ID NO: 48. Noutra forma de realização, a Δ9-elongase compreende os aminoácidos tendo uma sequência fornecida na SEQ ID NO: 50, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 50 % idêntica à SEQ ID NO: 50. Noutra forma de realização, a Δ9-elongase tem maior atividade sobre um substrato de ω6 do que sobre o substrato de ω3 correspondente, ou o inverso.

Como utilizado no presente documento, o termo "tem

maior atividade sobre um substrato de ω6 do que sobre o substrato de ω3 correspondente" refere-se à atividade relativa da enzima em substratos que diferem pela ação de uma ω3-dessaturase. Preferentemente, o substrato de ω6 é LA e o substrato de ω3 é ALA.

Uma elongase com atividade Δ6-elongase e Δ9-elongase é, pelo menos, capaz de (iÉ converter SDA em ETA e (iiÉ converter ALA em ETrA e tem maior atividade de Δ6-elongase do que atividade de Δ9-elongase. Numa forma de realização, a elongase tem uma eficiência de conversão sobre SDA para produzir ETA que é pelo menos 50 %, mais preferentemente pelo menos 60 %, e/ou uma eficiência de conversão de ALA para produzir ETrA que é, pelo menos, 6 % ou mais preferentemente, pelo menos 9 %. Noutra forma de realização, a elongase tem, pelo menos, cerca de 6,5 vezes maior atividade de Δ6-elongase do que atividade de Δ9-elongase. Numa forma de realização adicional, a elongase não tem qualquer atividade de Δ5-elongase detetável

Outras enzimas

Como utilizado no presente documento, o termo "1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferase" (LPAATÉ, também denominada ácido lisofosfatídico-aciltransferase ou acilCoA-lisofosfatidato-aciltransferase, refere-se a uma proteína que acila *sn*-1-acil-glicerol-3-fosfato (*sn*-1 G-3-PÉ na posição *sn*-2 de modo a formar ácido fosfatídico (PAÉ. Assim, o termo "atividade de 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferase" refere-se à acilação de (*sn*-1 G-3-PÉ na posição *sn*-2 para produzir PA (EC 2.3.1.51É. LPAATs preferenciais são aquelas que podem usar um acil-CoA C22 polinsaturado como substrato para transferir o grupo acilo C22 polinsaturado na posição *sn*-2 de LPA, formando PA. Tais LPAATs são exemplificados no Exemplo 13 e podem ser testados como aí descrito. Numa forma de realização, um LPAAT útil para a invenção compreende os aminoácidos tendo uma sequência como indicada em qualquer uma das SEQ ID NOs:

63 a 69, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 40 % idêntica a qualquer uma ou mais das SEQ ID NOs: 63 a 69. Numa forma de realização preferencial, um LPAAT útil para a invenção compreende os aminoácidos tendo uma sequência como indicado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 64, 65 e 67, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 40 % idêntica a qualquer uma ou mais das SEQ ID NOs: 64, 65 e 67.

Como utilizado no presente documento, o termo "diacilglicerol aciltransferase" (EC 2.3.1.20; DGATÉ refere-se a uma proteína que transfere um grupo acilo gordo a partir de acil-CoA para um substrato de diacilglicerol para produzir um triacilglicerol. Assim, o termo "atividade de diacilglicerol aciltransferase" refere-se à transferência de acil-CoA para diacilglicerol para produzir triacilglicerol. Existem três tipos conhecidos de DGAT referidos como DGAT1, DGAT2 e DGAT3 respetivamente. Polipéptidos DGAT1 normalmente têm 10 domínios transmembrana, DGAT2 normalmente têm dois domínios transmembrana, enquanto DGAT3 é tipicamente solúvel. Exemplos de polipéptidos DGAT1 incluem polipéptidos codificados por genes DGAT1 de *Aspergillus fumigatus* (N.° de acesso XP_755172É, *Arabidopsis thaliana* (CAB44774É, *Ricinus communis* (AAR11479É, *Vernicia fordii* (ABC94472É, *Vernonia galamensis* (ABV21945, ABV21946É, *Euonymus alatus* (AAV31083É, *Caenorhabditis elegans* (AAF82410É, *Rattus norvegicus* (NP_445889É, *Homo sapiens* (NP_036211É, bem como as variantes e/ou mutantes. Exemplos de polipéptidos DGAT2 incluem polipéptidos codificados por genes DGAT2 de *Arabidopsis thaliana* (N.° de acesso NP_566952É, *Ricinus communis* (AAY16324É, *Vernicia fordii* (ABC94474É, *Mortierella ramanniana* (AAK84179É, *Homo sapiens* (Q96PD7, Q58HT5É, *Bos taurus* (Q70VD8É, *Mus musculus* (AAK 84175É, *Micromonas* CCMP1545, assim como variantes e/ou mutantes.

Exemplos de polipéptidos DGAT3 incluem polipéptidos codificados por genes DGAT3 de amendoim (*Arachis hypogaea*, Saha, *et al.*, 2006É, bem como as variantes e/ou mutantes.

Polipéptidos/péptidos

O termo "recombinante", no contexto de um polipéptido refere-se a quando o polipéptido produzido por uma célula, ou num sistema de expressão livre de células, numa quantidade alterada ou a uma taxa alterada, em comparação com o seu estado nativo se for produzido de forma natural. Numa forma de realização, a célula é uma célula que não produz o polipéptido de forma natural. No entanto, a célula pode ser uma célula compreendendo um gene não endógeno que faz com que seja produzida uma quantidade alterada do polipéptido. Um polipéptido recombinante para utilização na presente invenção inclui polipéptidos na célula, tecido, órgão ou organismo, ou sistema de expressão livre de células, em que é produzido, ou seja, um polipéptido que não foi purificado ou separado dos outros componentes da célula transgénica (recombinanteÉ em que foi produzido, e polipéptidos produzidos nessas células ou sistemas isentos de células, que são subsequentemente separados por purificação de, pelo menos, alguns outros componentes.

Os termos "polipéptido" e "proteína" são geralmente utilizados indistintamente.

Um polipéptido ou classe de polipéptidos podem ser definidos pela extensão de identidade (% de identidadeÉ da sua sequência de aminoácidos em relação a uma sequência de aminoácidos de referência, ou por ter uma maior % de identidade para uma sequência de aminoácidos de referência do que para outra. A % de identidade de um polipéptido em relação a uma sequência de aminoácidos de referência é tipicamente determinada por análise GAP (Needleman e Wunsch, 1970; programa GCGÉ com parâmetros de uma penalização de criação de uma lacuna = 5, e uma penalização de extensão de lacuna = 0,3. A sequência de pesquisa tem

pelo menos 15 aminoácidos de comprimento, e a análise GAP alinha duas sequências através de uma região de pelo menos 15 aminoácidos. Mais preferentemente, a sequência de pesquisa tem pelo menos 50 aminoácidos de comprimento, e a análise GAP alinha duas sequências através de uma região de pelo menos 50 aminoácidos. Mais preferentemente, a sequência de pesquisa tem pelo menos 100 aminoácidos de comprimento e a análise GAP alinha duas sequências através de uma região de pelo menos 100 aminoácidos. Ainda mais preferentemente, a sequência de pesquisa tem pelo menos 250 aminoácidos de comprimento e a análise GAP alinha duas sequências através de uma região de pelo menos 250 aminoácidos. Ainda mais preferentemente, a análise GAP alinha duas sequências ao longo de todo o seu comprimento. O polipéptido ou classe de polipéptidos podem ter a mesma atividade enzimática, ou uma atividade diferente, ou não possuem a atividade do polipéptido de referência. Preferentemente, o polipéptido tem uma atividade enzimática de pelo menos 10 %, pelo menos 50 %, pelo menos 75 % ou pelo menos 90 % da atividade do polipéptido de referência.

Como utilizado no presente documento, um fragmento "biologicamente ativo" é uma porção de um polipéptido definido no presente documento e que mantém uma atividade definida de um polipéptido de referência de comprimento completo, por exemplo, possuindo atividade de dessaturase e/ou de elongase ou outra atividade enzimática. Os fragmentos biologicamente ativos como utilizados no presente documento excluem o polipéptido de comprimento completo. Os fragmentos biologicamente ativos podem ter qualquer tamanho de porção, desde que mantenham a atividade definida. Preferentemente, o fragmento biologicamente ativo mantém pelo menos 10 %, pelo menos 50 %, pelo menos 75 % ou pelo menos 90 %, da atividade da proteína de comprimento completo.

No que diz respeito a um polipéptido ou uma enzima

definida, será apreciado que valores de % de identidade mais elevados do que aqueles aqui proporcionados irão abranger formas de realização preferenciais. Assim, se for o caso, em função dos valores mínimos de % de identidade, é preferencial que o polipéptido/enzima compreenda uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 60 %, mais preferentemente pelo menos 65 %, mais preferentemente pelo menos 70 %, mais preferentemente pelo menos 75 %, mais preferentemente pelo menos 76 %, mais preferentemente pelo menos 80 %, mais preferentemente pelo menos 85 %, mais preferentemente pelo menos 90 %, mais preferentemente pelo menos 91 %, mais preferentemente pelo menos 92 %, mais preferentemente pelo menos 93 %, mais preferentemente pelo menos 94 %, mais preferentemente pelo menos 95 %, mais preferentemente pelo menos 96 %, mais preferentemente pelo menos 97 %, mais preferentemente pelo menos 98 %, mais preferentemente pelo menos 99 %, mais preferentemente pelo menos 99,1 %, mais preferentemente pelo menos 99,2 %, mais preferentemente pelo menos 99,3 %, mais preferentemente pelo menos 99,4 %, mais preferentemente pelo menos 99,5 %, mais preferentemente pelo menos 99,6 %, mais preferentemente pelo menos 99,7 %, mais preferentemente pelo menos 99,8 %, e ainda mais preferentemente pelo menos 99,9 % idêntica à SEQ ID NO nominada relevante.

Variantes/mutantes de sequência de aminoácidos dos polipéptidos definidos no presente documento podem ser preparadas por introdução das alterações de nucleótidos apropriadas num ácido nucleico aqui definido, ou por síntese *in vitro* do polipéptido desejado. Tais variantes/mutantes incluem, por exemplo, deleções, inserções ou substituições de resíduos dentro da sequência de aminoácidos. Uma combinação de deleção, inserção e substituição pode ser feita para chegar à construção final, desde que o produto peptídico final possua a atividade enzimática desejada.

Péptidos mutantes (alteradosÉ podem ser preparados utilizando qualquer técnica conhecida na técnica. Por exemplo, um polinucleótido definido no presente documento pode ser submetido a mutagénese *in vitro* ou técnicas de baralhamento de ADN tão amplamente descrito por Harayama (1998É. Os produtos derivados de ADN mutados/alterados podem ser facilmente pesquisados utilizando as técnicas descritas no presente documento para determinar se possuem, por exemplo, atividade de dessaturase ou elongase.

Na concepção de mutantes da sequência de amino ácido, a localização do local da mutação e a natureza da mutação dependerão da(sÉ característica(sÉ a serem modificadas. Os locais para mutação podem ser modificados individualmente ou em série, por exemplo, por (1É substituindo primeiro com escolhas de aminoácidos conservativos e depois com seleções mais radicais dependendo dos resultados alcançados, (2É eliminando o resíduo alvo, ou (3É inserindo outros resíduos adjacentes ao local localizado.

Deleções de sequências de aminoácidos variam geralmente de cerca de 1 a 15 resíduos, mais preferentemente cerca de 1 a 10 resíduos e tipicamente cerca de 1 a 5 resíduos contíguos.

Mutantes de substituições possuem pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de polipéptido removida e um resíduo diferente inserido no seu lugar. Os locais de maior interesse para mutagénese de substituição incluem sítios que não são conservados entre dessaturases ou elongases que ocorrem naturalmente. Estes locais são substituídos preferentemente, de uma maneira relativamente conservadora, a fim de manter a atividade da enzima. Tais substituições conservativas são apresentadas no Quadro 3, sob o título de "substituições exemplares".

Numa forma de realização preferencial, um polipéptido mutante/variante tem apenas, ou não mais do que, uma ou duas ou três ou quatro mudanças de aminoácidos

conservativas, quando comparado com um polipéptido que ocorre naturalmente. Detalhes de alterações de aminoácidos conservativas são apresentados no Quadro 3. Como o perito na especialidade estaria ciente, tais pequenas alterações podem ser razoavelmente previstas para não alterar a atividade do polipéptido, quando expressas numa célula recombinante.

Os polipéptidos podem ser produzidos numa variedade de maneiras, incluindo a produção e recuperação de polipéptidos naturais ou polipéptidos recombinantes de acordo com métodos conhecidos na técnica. Numa forma de realização, um polipéptido recombinante é produzido por cultura de uma célula capaz de expressar o polipéptido sob condições eficazes para produzir o polipéptido, como uma célula hospedeira definida no presente documento. Uma célula mais preferencial para produzir o polipéptido é uma célula numa planta, especialmente numa semente numa planta.

Polinucleótidos

O pedido também descreve e/ou a invenção utiliza polinucleótidos que podem ser, por exemplo, um gene, um polinucleótido isolado, uma construção genética quimérica, como uma molécula de T-ADN, ou um ADN quimérico. Pode ser ADN ou ARN de origem genómica ou sintética, com cadeia dupla simples ou cadeia única, e combinado com hidratos de carbono, lípidos, proteínas ou outros materiais para realizar uma atividade específica definida no presente documento. O termo "polinucleótido" é utilizado no presente documento indiferentemente com o termo "molécula de ácido nucleico". Por "polinucleótido isolado" entende-se um polinucleótido que, se obtido a partir de uma fonte natural, foi separado a partir das sequências de polinucleótidos com o qual estão associadas ou ligadas no seu estado nativo, ou um polinucleótido de ocorrência não natural. Preferentemente, o polinucleótido isolado que é pelo menos 60 % livre, mais preferentemente pelo menos 75 %

livre e mais preferentemente pelo menos 90 % livre de outros componentes com os quais está naturalmente associado.

QuadroÓ3. Substituições exemplificativas.

ResíduoÓoriginalÓ	**SubstituiçõesÓexemplificativas**
Ala (AÉ	val; leu; ile; gly
Arg (RÉ	lys
Asn (NÉ	gln; his
Asp (DÉ	glu
Cys (CÉ	ser
Gln (QÉ	asn; his
Glu (EÉ	asp
Gly (GÉ	pro, ala
His (HÉ	asn; gln
Ile (IÉ	leu; val; ala
Leu (LÉ	ile; val; met; ala; phe
Lys (KÉ	arg
Met (MÉ	leu; phe
Phe (FÉ	leu; val; ala
Pro (PÉ	gly
Ser (SÉ	thr
Thr (TÉ	ser
Trp (WÉ	tyr

Tyr (YÉ	trp; phe
Val (VÉ	ile; leu; met; phe, ala

Num aspeto, um polinucleótido para utilização na invenção é de ocorrência não natural. Exemplos de polinucleótidos de ocorrência não natural incluem, entre outros, aqueles que foram mutados (por exemplo, usando os métodos descritos no presente documentoÉ, e os polinucleótidos onde uma grelha de leitura aberta que codifica uma proteína está operativamente ligada a um promotor ao qual não está naturalmente associado (como nas construções descritas no presente documentoÉ.

Como utilizado no presente documento, o termo "gene" deve ser considerado no seu contexto mais amplo e inclui as sequências que compreendem a região de desoxirribonucleótidos transcrita e, se traduzida, a região codificadora de proteína, de um gene estrutural e incluindo sequências localizadas adjacentes à região de codificação sobre ambas as extremidades 5' e 3', por uma distância de pelo menos cerca de 2 kb em cada extremidade e que estão envolvidas na expressão do gene. A este respeito, o gene inclui sinais de controlo, como promotores, potencializadores, sinais de terminação e/ou de poliadenilação que estão naturalmente associados com um dado gene, ou sinais de controlo heterólogos, caso em que o gene é referido como um "gene quimérico". As sequências que estão localizadas a 5' da região de codificação de proteína e que estão presentes no ARNm são referidas como sequências 5' não traduzidas. As sequências que estão localizadas a 3' ou a jusante da região de codificação de proteína e que estão presentes no ARNm são referidas como sequências 3' não traduzidas. O termo "gene" engloba ambas as formas de ADNc e genómicas de um gene. A forma genómica ou de um gene do clone contém a região de codificação que pode ser

interrompida com sequências de não codificação denominadas "intrões" ou "regiões intervenientes" ou "sequências intervenientes." Os intrões são segmentos de um gene que são transcritos em ARN nuclear (hnARNÉ. Os intrões podem conter elementos reguladores, como potencializadores. Os intrões são removidos ou removidos por *splicing* a partir da transcrição nuclear ou primária; intrões, por conseguinte, estão ausentes na transcrição de ARN mensageiro (ARNmÉ. O ARNm funciona durante a tradução para especificar a sequência ou ordem dos aminoácidos num polipéptido nascente. O termo "gene" inclui uma molécula sintética ou de fusão que codifica a totalidade ou uma parte das proteínas para utilização na invenção aqui descritas e uma sequência de nucleótidos complementar a qualquer um dos acima.

Como utilizado no presente documento, um "ADN quimérico" ou "construção genética quimérica" refere-se a qualquer molécula de ADN que não é uma molécula de ADN nativa na sua localização nativa, também aqui referida como uma "construção de ADN". Tipicamente, um ADN quimérico ou gene quimérico compreende sequências regulatórias e transcritas ou que codificam proteínas que não são encontradas operativamente ligadas entre si na natureza, ou seja, que são heterólogas em relação umas às outras. Assim, um ADN quimérico ou gene quimérico pode compreender as sequências reguladoras e sequências codificadoras, que são derivadas a partir de diferentes fontes, ou sequências reguladoras e sequências codificadoras derivadas da mesma fonte, mas dispostas de um modo diferente do que as encontradas na natureza.

O termo "endógeno" é utilizado no presente documento para referir-se a uma substância que se encontra normalmente presente em, ou é produzida, por exemplo, numa planta não modificada no mesmo estágio de desenvolvimento como as plantas em estudo. Um "gene endógeno" refere-se a

um gene nativo na sua localização natural no genoma de um organismo. Como utilizado no presente documento, "molécula de ácido nucleico recombinante", "polinucleótido recombinante" ou as suas variações referem-se a uma molécula de ácido nucleico que foi construída ou modificada por tecnologia de ADN recombinante. Os termos "polinucleótido estranho" ou "polinucleótido exógeno" ou "polinucleótido heterólogo" e semelhantes referem-se a qualquer ácido nucleico que é introduzido no genoma de uma célula por meio de manipulações experimentais. Os genes estranhos ou exógenos podem ser genes que são inseridos num organismo não nativo, genes nativos introduzidos num novo local no hospedeiro nativo, ou genes quiméricos. Um "transgene" é um gene que foi introduzido no genoma por um procedimento de transformação. Os termos "geneticamente modificado", "transgénico" e variações dos mesmos incluem a introdução de genes nas células por transformação ou transdução, mutação de genes em células e alterando ou modulando a regulação de um gene numa célula ou organismos nos quais estes atuam foram feitos ou a sua descendência. Uma "região genómica" como aqui utilizada refere-se a uma posição dentro do genoma de um transgene, ou um grupo de transgenes (também aqui referido como um agrupamentoÉ, foi inserido numa célula, ou num antecessor dos mesmos. Tais regiões compreendem apenas os nucleótidos que foram incorporados pela intervenção do homem, como por meio de métodos descritos no presente documento.

O termo "exógeno" no contexto de um polinucleótido refere-se ao polinucleótido, quando presente numa célula numa quantidade alterada comparado com o seu estado nativo. Numa forma de realização, a célula é uma célula que naturalmente não compreende o polinucleótido. No entanto, a célula pode ser uma célula compreendendo um polinucleótido não endógeno resultando numa quantidade alterada de produção do polipéptido codificado. Um polinucleótido

exógeno para utilização na invenção inclui polinucleótidos que não foram separados dos outros componentes da célula transgénica (recombinanteÉ, ou sistema de expressão livre de células, em que está presente, e polinucleótidos produzidos nessas células ou sistemas isentos de células, que são subsequentemente purificados a partir de, pelo menos, alguns outros componentes. O polinucleótido exógeno (ácido nucleicoÉ pode ser uma extensão contígua de nucleótidos existentes na natureza, ou compreender dois ou mais extensões de nucleótidos contíguos a partir de diferentes fontes (que ocorrem naturalmente e/ou sintéticosÉ unidos para formar um único polinucleótido. Tipicamente, estes polinucleótidos quiméricos compreendem pelo menos uma grelha de leitura aberta que codifica um polipéptido para utilização na presente invenção operativamente ligado a um promotor adequado da transcrição da direção da grelha de leitura aberta numa célula de interesse.

Como utilizado no presente documento, o termo "diferentes polinucleótidos exógenos" ou suas variações significa que a sequência de nucleótidos de cada polinucleótido é diferente em pelo menos um, preferentemente mais, nucleótidos. Os polinucleótidos que codificam os ARN podem ou não ser traduzidos numa proteína na célula. Num exemplo, é preferencial que cada polinucleótido codifique para uma proteína com uma atividade diferente. Noutro exemplo, cada polinucleótido exógeno é menos do que 95 %, menos do que 90 %, ou menos do que 80 % idêntico aos outros polinucleótidos exógenos. Preferentemente, os polinucleótidos exógenos codificam proteínas funcionais/enzimas. Além disso, prefere-se que os diferentes polinucleótidos exógenos não se sobreponham no sentido em que cada polinucleótido é uma região distinta de, por exemplo, ácido nucleico de transferência extracromossómica que não se sobrepõe com outro

polinucleótido exógeno. No mínimo, cada polinucleótido exógeno tem um início da transcrição e o local de paragem, bem como o promotor designado. Um polinucleótido exógeno individual pode ou não incluir intrões.

Em relação aos polinucleótidos definidos, deve ser observado que valores de % de identidade mais elevados do que os fornecidos acima irão abranger formas de realização preferenciais. Assim, se for o caso, em função dos valores mínimos de % de identidade, é preferencial que o polinucleótido compreenda uma sequência de polinucleótidos que é pelo menos 60 %, mais preferentemente pelo menos 65 %, mais preferentemente pelo menos 70 %, mais preferentemente pelo menos 75 %, mais preferentemente, pelo menos 80 %, mais preferentemente pelo menos 85 %, mais preferentemente pelo menos 90 %, mais preferentemente pelo menos 91 %, mais preferentemente pelo menos 92 %, mais preferentemente pelo menos 93 %, mais preferentemente pelo menos 94 %, mais preferentemente pelo menos 95 %, mais preferentemente pelo menos 96 %, mais preferentemente pelo menos 97 %, mais preferentemente pelo menos 98 %, mais preferentemente pelo menos 99 %, mais preferentemente pelo menos 99,1 %, mais preferentemente pelo menos 99,2 %, mais preferentemente pelo menos 99,3 %, mais preferentemente pelo menos 99,4 %, mais preferentemente pelo menos 99,5 %, mais preferentemente pelo menos 99,6 %, mais preferentemente pelo menos 99,7 %, mais preferentemente pelo menos 99,8 % e ainda mais preferentemente pelo menos 99,9 % da SEQ ID NO nominada relevante.

Um polinucleótido para utilização na presente invenção pode hibridar seletivamente, sob condições de restritividade, com um polinucleótido que codifica um polipéptido da presente invenção. Como utilizado no presente documento, condições de restritividade são aquelas que (1É empregam durante a hibridização um agente desnaturante, como formamida, por exemplo, 50 % (v/vÉ de

formamida com 0,1 % (p/vÉ de albumina de soro bovino, Ficoll a 0,1 %, polivinilpirrolidona a 0,1 %, tampão fosfato de sódio a 50 mM a pH 6,5 com NaCl a 750 mM, citrato de sódio a 75 mM em 42°C; ou (2É empregam formamida a 50 %, 5 x SSC (NaCl a 0,75 M, citrato de sódio a 0,075 MÉ, fosfato de sódio a 50 mM (pH 6,8É, pirofosfato de sódio a 0,1 %, 5 x solução de Denhardt, ADN de esperma de salmão sonicado (50 g/mlÉ, SDS a 0,1 % e sulfato de dextrano a 10 % a 42°C em 0,2 x SSC e SDS a 0,1 % e/ou (3É empregam baixa força iónica e temperatura elevada para lavagem, por exemplo, NaCl a 0,015 M/citrato de sódio a 0,0015 M/SDS a 0,1 % a 50 °C.

Os polinucleótidos para utilização na invenção podem possuir, quando comparados com moléculas que ocorrem naturalmente, uma ou mais mutações que são deleções, inserções ou substituições de resíduos de nucleótidos. Os polinucleótidos que possuem mutações em relação a uma sequência de referência podem ser de origem natural (isto é, isolados a partir de uma fonte naturalÉ ou sintética (por exemplo, através da realização de mutagénese de baralhamento de ADN sítio-dirigida no ácido nucleico como descrito acimaÉ. Assim, é aparente que os polinucleótidos para utilização na invenção podem ser provenientes de uma fonte recombinante ou ocorrer naturalmente. Polinucleótidos preferenciais são aqueles que têm regiões de codificação que são codões otimizados para tradução em células de plantas, como é conhecido na técnica.

Vetores recombinantes

Um aspeto do presente pedido inclui um vetor recombinante, compreendendo pelo menos uma molécula de polinucleótido definida no presente documento, inserida em qualquer vetor capaz de libertar a molécula de polinucleótido numa célula hospedeira. Os vetores recombinantes incluem vetores de expressão. Os vetores recombinantes contêm sequências de polinucleótidos

heterólogos, isto é, sequências de polinucleótidos que não são encontrados naturalmente adjacentes às moléculas polinucleotídicas definidas no presente documento que são preferentemente derivadas de uma espécie além da espécie a partir da qual as moléculas de polinucleótido são derivadas. O vetor pode ser de ARN ou ADN e, tipicamente, é um plasmídeo. Vetores plasmídicos incluem tipicamente sequências de ácidos nucleicos adicionais que proporcionam a fácil seleção, amplificação, e transformação da cassete de expressão em células procarióticas, por exemplo, vetores, derivados de pUC-pSK, vetores, vetores derivados de pGEM, vetores derivados de pSP, vetores derivados de pBS, ou preferentemente vetores binários contendo uma ou mais regiões de T-ADN. As sequências de ácidos nucleicos incluem origens de replicação para fornecer replicação autónoma do vetor, genes marcadores selecionáveis, preferentemente, que codificam a resistência aos antibióticos ou a herbicidas, vários sítios únicos de clonagem preveem vários locais para inserir sequências de ácidos nucleicos ou genes codificados na construção de ácido nucleico, e sequências que intensificam a transformação de células procarióticas e eucarióticas (especialmente plantasÉ. O vetor recombinante pode compreender mais do que um polinucleótido aqui definido, por exemplo, três, quatro, cinco ou seis polinucleótidos aqui definidos, em combinação, preferentemente, uma construção genética quimérica como descrita no presente documento, cada polinucleótido operativamente ligado a sequências de controlo de expressão que são operáveis na célula de interesse. Mais do que um polinucleótido aqui definido, por exemplo, três, quatro, cinco ou seis polinucleótidos, são preferentemente ligados covalentemente em conjunto num único vetor recombinante, preferentemente, dentro de uma molécula única de T-ADN, que pode então ser introduzida como uma única molécula numa célula para formar

uma célula recombinante de acordo com a invenção, e preferentemente, integrado no genoma da célula recombinante, por exemplo, numa planta transgénica. Assim, os polinucleótidos que estão unidos deste modo serão herdados em conjunto como um único locus genético na descendência da célula ou planta recombinante. O vetor recombinante ou planta pode compreender dois ou mais de tais vetores recombinantes, contendo cada um vários polinucleótidos, por exemplo, em que cada vetor recombinante compreende 3, 4, 5 ou 6 polinucleótidos.

"Operativamente ligado", como utilizado no presente documento refere-se a uma relação funcional entre dois ou mais segmentos de ácidos nucleicos (por exemplo, ADNÉ. Tipicamente, refere-se à relação funcional do elemento de regulação da transcrição (promotorÉ para uma sequência transcrita. Por exemplo, um promotor está operativamente ligado a uma sequência de codificação, como um polinucleótido aqui definido, se este estimula ou modula a transcrição da sequência de codificação numa célula apropriada. Geralmente, elementos reguladores de transcrição do promotor que são ligados de forma operativa a uma sequência transcrita são fisicamente contíguos à sequência transcrita, ou seja, eles são cis-atuantes. No entanto, alguns elementos reguladores da transcrição, como intensificadores, não precisam ser contíguos ou fisicamente localizados em estreita proximidade com as sequências de codificação cuja transcrição aumentam.

Quando estão presentes vários promotores, cada promotor pode ser independentemente o mesmo ou diferente.

Moléculas recombinantes, como os ADNs quiméricos ou construções genéticas podem também conter (aÉ um ou mais sinais de secreção, que codificam sequências de péptidos de sinal, para permitir que um polipéptido expresso definido no presente documento seja segregado a partir da célula que produz o polipéptido ou que fornece para a localização do

polipéptido expresso, por exemplo, para a retenção do polipéptido no retículo endoplasmático (REÉ na célula ou transferir para um plastídio, e/ou (bÉ conter sequências de fusão que conduzem à expressão de moléculas de ácido nucleico como proteínas de fusão. Exemplos de segmentos de sinal adequados incluem qualquer segmento de sinal capaz de direcionar a secreção ou localização de um polipéptido como definido no presente documento. Moléculas recombinantes podem também incluir sequências de intervenção e/ou não traduzidas em torno e/ou dentro das sequências de ácidos nucleicos de moléculas de ácido nucleico aqui definidas.

Para facilitar a identificação dos transformantes, a construção de ácido nucleico compreende, desejavelmente, um gene marcador selecionável ou pesquisável como, ou em adição ao polinucleótido estranho ou exógeno. Por "gene marcador" entende-se um gene que confere um fenótipo distinto de células que expressam o gene marcador e, assim, permite que estas células transformadas sejam distinguidas a partir de células que não possuem o marcador. Um gene marcador selecionável confere uma característica pela qual se pode "selecionar" com base na resistência a um agente seletivo (por exemplo, um herbicida, antibiótico, radiação, calor ou outro tratamento para danificar as células não transformadasÉ. Um gene marcador detetável (ou genes repórterÉ confere uma característica que se pode identificar através da observação ou ensaio, ou seja, por "triagem" (por exemplo, β-glucuronidase, luciferase, GFP ou outra atividade de enzima que não está presente em células não transformadasÉ. O gene marcador e a sequência de nucleótidos de interesse não tem que ser ligada. A escolha real de um marcador não é crucial, desde que seja funcional (isto é, seletivoÉ em combinação com as células de escolha, como uma célula vegetal.

Exemplos de marcadores selecionáveis bacterianos são marcadores que conferem resistência a antibióticos como

ampicilina, eritromicina, cloranfenicol ou resistência à tetraciclina, preferentemente de resistência à canamicina. Exemplos de marcadores selecionáveis para a seleção de transformantes de plantas incluem, entre outros, um gene *hyg*, que codifica resistência à higromicina B; um gene de neomicina fosfotransferase (*nptII*É que confere resistência a canamicina, a paramomicina, a G418; um gene de glutationa-S-transferase de fígado de rato que confere resistência a herbicidas derivados de glutationa como, por exemplo, descrito no documento EP 256223; um gene glutamina sintetase que confere, sob a superexpressão, resistência a inibidores de glutamina sintetase, como fosfinotricina como, por exemplo, descritos no documento WO 87/05327, um gene de acetiltransferase de *Streptomyces viridochromogenes* conferindo resistência ao agente seletivo como a fosfinotricina, por exemplo, descrito no documento EP 275957, um gene que codifica para uma 5-enolshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPSÉ que conferem tolerância a N-fosfonometilglicina como, por exemplo, descrito por Hinchee *et al.* (1988É, um gene *bar* que confere resistência contra a bialafos como, por exemplo, descritos no documento WO91/02071; um gene de nitrilase, como *bxn* a partir de *Klebsiella ozaenae* que confere resistência a bromoxinilo (Stalker *et al.*, 1988É; um gene di-hidrofolato redutase (DHFRÉ que confere resistência ao metotrexato (Thillet *et al.*, 1988É; um gene de acetolactato sintase mutante (ALSÉ que confere resistência a imidazolinona, sulfonilureia ou a outras substâncias químicas que inibem ALS (EP 154204É; um gene de antranilato sintetase mutante que confere resistência ao 5-metil triptofano; ou um gene dalapão desalogenase que confere resistência ao herbicida.

Marcadores preferenciais triáveis incluem, entre outros, um gene *uidA* que codifica uma enzima β-glucuronidase (GUSÉ para o qual são conhecidos vários substratos cromogénicos, um gene da proteína fluorescente

verde ou seus derivados (Niedz *et al.*, 1995É; um gene luciferase (*luc*É (Ow *et al.*, 1986É, que permite a deteção de bioluminescência, e outros conhecidos na técnica. Por "molécula repórter", conforme utilizado na presente memória descritiva entende-se uma molécula que, pela sua natureza química, proporciona um sinal analiticamente identificável que facilita a determinação da atividade promotora com referência ao produto proteico.

Preferentemente, a construção de ácido nucleico é incorporada de forma estável no genoma da célula, como a célula vegetal. Consequentemente, o ácido nucleico pode compreender elementos apropriados que permitem que a molécula seja incorporada no genoma, preferentemente as sequências de fronteira do lado direito esquerdo de uma molécula de T-ADN, ou a construção é colocada num vetor apropriado, que pode ser incorporado num cromossoma da célula.

Expressão

Como utilizado no presente documento, um vetor de expressão é um vetor de ADN que é capaz de transformar uma célula hospedeira e de realizar a expressão de uma ou mais moléculas de polinucleótido especificadas. Os vetores de expressão preferenciais para utilização na presente invenção podem direcionar a expressão de genes em leveduras e/ou células vegetais. Os vetores de expressão úteis para a presente invenção contêm sequências reguladoras, como sequências de controlo da transcrição, sequências de controlo da tradução, as origens de replicação e outras sequências reguladoras que são compatíveis com a célula recombinante e o controlo da expressão de moléculas polinucleotídicas como descritas no presente documento. Em particular, os polinucleótidos ou vetores úteis para a presente invenção incluem sequências de controlo da transcrição. As sequências de controlo de transcrição são sequências que controlam a iniciação, alongamento e

terminação da transcrição. As sequências de controlo de transcrição importante, particularmente são as que controlam a iniciação da transcrição, como sequências promotoras e potencializadoras. As sequências de controlo de transcrição adequadas incluem qualquer sequência de controlo da transcrição que podem funcionar em pelo menos uma das células recombinantes da presente invenção. A escolha das sequências reguladoras usadas depende do organismo alvo como uma planta e/ou órgão ou tecido alvo de interesse. Tais sequências reguladoras podem ser obtidas a partir de qualquer organismo eucariótico, como plantas ou vírus de plantas, ou podem ser sintetizadas quimicamente. Uma variedade de tais sequências de controlo da transcrição é conhecida pelos peritos na especialidade. As sequências de controlo da transcrição particularmente preferenciais são promotores ativos no direcionamento da transcrição em plantas, seja constitutivamente ou de forma específica de estádio ou tecido, dependendo da utilização da planta ou suas partes.

Uma série de vetores adequados para a transfeção estável de células vegetais ou para o estabelecimento de plantas transgénicas é descrita em, por exemplo, Pouwels *et al.*, Cloning Vectors:. A Laboratory Manual, 1985, sup. 1987; Weissbach e Weissbach, Methods of Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989; e Gelvin *et al.*, Plant Molecular Biology manual, Kluwer Academic Publishers, 1990. Normalmente, vetores de expressão de plantas incluem, por exemplo, um ou mais genes de plantas clonados sob o controlo de transcrição das sequências de regulação 5' e 3' e um marcador de seleção dominante. Tais vetores de expressão de plantas também podem conter uma região reguladora do promotor (por exemplo, uma região reguladora de controlo de expressão induzível ou constitutiva, regulada pelo ambiente ou desenvolvimento, ou expressão específica de células ou tecidosÉ, um local de iniciação da

transcrição, um local de ligação ao ribossoma, um sinal de processamento de ARN, um local de terminação da transcrição, e/ou um sinal de poliadenilação.

Foi descrita uma série de promotores constitutivos que são ativos nas células vegetais. Os promotores adequados para a expressão constitutiva em plantas incluem, entre outros, o promotor 35S de vírus do mosaico da couve-flor (CaMVÉ, promotor 35S vírus do mosaico Figwort (FMVÉ, o promotor de vírus baciliforme de cana de açúcar, o promotor do vírus do mosqueado amarelo de Commelina, o promotor induzível por luz da subunidade pequena da carboxilase de ribulose-1,5-bis-fosfato, o promotor citosólico triosefosfato isomerase de arroz, o promotor adenina fosforibosiltransferase da *Arabidopsis*, o promotor do gene da actina 1 de arroz, os promotores da de manopina sintase e octopina sintase, o promotor Adh, promotor sacarose sintase, o promotor de complexo de genes R, e o promotor de gene de proteína de ligação a clorofila α/β.

Para efeitos de expressão em tecidos de origem da planta, como a folha, semente, raiz ou caule, prefere-se que os promotores utilizados na presente invenção tenham expressão relativamente alta nestes tecidos específicos. Para este propósito, pode-se escolher a partir de uma série de promotores para genes com expressão específica para tecido ou célula melhorada. Exemplos de tais promotores descritos na literatura incluem o promotor GS2 de glutamina sintetase de cloroplasto de ervilha, o promotor frutose 1,6-bifosfatase de cloroplasto de trigo, o promotor ST-LS1 fotossintético nuclear a partir de batata, o promotor de serina/treonina quinase e o promotor glicoamilase (CHSÉ de *Arabidopsis thaliana*. Também reportaram ser ativos em tecidos fotossinteticamente ativos os promotores de ribulose-1,5 bisfosfato carboxilase e promotores de Cab.

Uma variedade de promotores de genes de plantas que são regulados em resposta a, sinais hormonais, químicos, de

desenvolvimento e/ou ambientais também pode ser usada para a expressão de genes em células de plantas, incluindo promotores regulados por (1É calor, (2É luz (por exemplo, promotor rbcS-3A de ervilha, promotor de RbcS de milhoÉ; (3É hormonas, como o ácido abscísico, (4É cicatrização (por exemplo, WunIÉ; ou (5É substâncias químicas, como jasmonato de metilo, ácido salicílico, hormonas esteroides, álcool, protetores (WO97/06269É, ou pode também ser vantajoso empregar (6É promotores específicos de órgãos.

Como utilizado no presente documento, o termo "promotor específico de sementes de plantas" ou suas variações referem-se a um promotor que, preferentemente, quando comparado com outros tecidos de plantas, direciona a transcrição de genes numa semente em desenvolvimento de uma planta. Numa forma de realização, o promotor específico de sementes é expresso, pelo menos, 5 vezes mais fortemente na semente em desenvolvimento da planta em relação às folhas e/ou talos da planta, e é preferentemente expresso mais fortemente no embrião da semente em desenvolvimento em comparação com outros tecidos da planta. Preferentemente, o promotor apenas dirige a expressão de um gene de interesse no desenvolvimento de sementes, e/ou a expressão do gene de interesse em outras partes da planta como as folhas não é detetável por análise de *Northern blot* e/ou RT-PCR. Tipicamente, o promotor direciona a expressão de genes durante o crescimento e desenvolvimento da semente, em particular durante a fase de síntese e acumulação de compostos de armazenamento na semente. Tais promotores podem direcionar a expressão de genes em toda a planta ou órgãos de armazenamento ou apenas uma parte do mesmo, como o tegumento, ou o(sÉ cotilédone(sÉ, preferentemente em embriões, em sementes de plantas dicotiledóneas ou o endosperma ou uma camada de aleurona das sementes de plantas monocotiledóneas.

Os promotores prefereridos para a expressão específica

de sementes incluem iÉ os promotores de genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos gordos e acumulação em sementes, como dessaturases e elongases, iiÉ a partir de promotores de genes que codificam proteínas de armazenamento da semente, e iiiÉ os promotores de genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de hidratos de carbono e acumulação em sementes. Promotores específicos de sementes, que são adequados são o promotor do gene da napina de canola (US 5.608.152É, o promotor USP de *Vicia faba* (Baumlein *et al.*, 1991É, o promotor da oleosina de *Arabidopsis* (WO98/45461É, o promotor da faseolina de *Phaseolus vulgaris* (US 5.504.200É, o promotor Bce4 de *Brassica* (WO91/13980É ou o promotor de legumina LeB4 de *Vicia faba* (Baumlein *et al.*, 1992É, e os promotores que conduzem à expressão específica de sementes em monocotiledóneas como milho, cevada, trigo, centeio, arroz e semelhantes. Promotores notáveis que são adequados são os promotores do gene lpt1 ou lpt2 de cevada (WO95/15389 e WO95/23230É ou os promotores descritos no documento WO99/16890 (promotores do gene hordeína de cevada, o gene da glutelina de arroz, o gene oryzin de arroz, o gene prolamina de arroz, o gene gliadina de trigo, o gene glutelina do trigo, do gene da zeína de milho, o gene da glutelina de aveia, o gene Kasirin de sorgo, gene secalina de centeioÉ. Outros promotores incluem os descritos por Broun *et al.* (1998É, Potenza *et al.* (2004É, US20070192902 e US20030159173. Numa forma de realização, o promotor específico de sementes é preferentemente expresso em partes definidas da semente, como o embrião, cotilédones ou o endosperma. Exemplos destes promotores específicos incluem, entre outros, o promotor FP1 (Ellerstrom *et al.*, 1996É, o promotor legumina de ervilha (Perrin *et al.*, 2000É, o promotor fitohemaglutinina de feijão (Perrin *et al.*, 2000É, os promotores conlinina 1 e conlinina 2 para os genes que codificam as proteínas de armazenamento 2S de linho (Cheng

et al., 2010É, o promotor do gene FAE1 de *Arabidopsis thaliana*, o promotor BnGLP do gene da proteína tipo globulina de *Brassica napus*, o promotor LPXR do gene de peroxiredoxina de *Linum usitatissimum*.

A sequência líder não traduzida 5' pode ser derivada a partir do promotor selecionado para expressar a sequência do gene heterólogo do polinucleótido descrito no presente documento, ou preferentemente, é heteróloga em relação à região de codificação da enzima a ser produzida, e pode ser especificamente modificada, se desejado, de modo a aumentar a tradução do ARNm. Para uma revisão para otimizar a expressão dos transgenes, ver Koziel *et al.* (1996É. Regiões não traduzidas 5' também podem ser obtidas a partir de ARNs virais de plantas (vírus do mosaico do tabaco, vírus de gravura do tabaco, vírus do mosaico do milho anão, vírus do mosaico de alfalfa, entre outrosÉ a partir de genes eucarióticos adequados, genes de plantas (gene líder de proteína de ligação a clorofila a/b de milho e trigoÉ, ou a partir de uma sequência génica sintética. A presente descrição não está limitada a construções em que a região não traduzida é derivada a partir da sequência 5' não traduzida que acompanha a sequência do promotor. A sequência líder também pode ser derivada de um promotor ou sequência de codificação não relacionados. Sequências líder úteis no contexto da presente invenção compreendem o líder Hsp70 de milho (US 5.362.865 e US 5.859.347É, e o elemento ómega de TMV.

A terminação da transcrição é realizada por uma sequência 3' não traduzida de ADN operativamente ligada ao vetor quimérico para o polinucleótido de interesse. A região 3' não traduzida de uma molécula de ADN recombinante contém um sinal de poliadenilação que funciona em plantas para provocar a adição de nucleótidos de adenilato à extremidade 3' do ARN. A região 3' não traduzida pode ser obtida a partir de vários genes que são expressos em

células vegetais. A região 3' não traduzida de nopalina sintase, a região 3' não traduzida do gene da subunidade pequena da Rubisco de ervilha, a região 3' não traduzida do gene da proteína de armazenamento 7S das sementes de soja ou um gene conlinina de linho são comummente utilizados nesta capacidade. As regiões 3' transcritas, não traduzidas contendo o sinal de poliadenilato dos genes de plasmídeo induzido por tumor de *Agrobacterium* (TiÉ são também adequados.

Tecnologias de ADN recombinante podem ser utilizadas para melhorar a expressão de uma molécula de polinucleótido transformada por manipulação, por exemplo, o número de cópias da molécula polinucleotídica na célula hospedeira, a eficiência com que as referidas moléculas polinucleotídicas são transcritas, a eficiência com que as transcrições resultantes são traduzidas, e a eficiência de modificações pós-tradução. As técnicas recombinantes úteis para o aumento da expressão de moléculas polinucleotídicas definidas no presente documento incluem, entre outras, a integração da molécula de polinucleótido num ou mais cromossomas da célula hospedeira, a adição de sequências de estabilidade de ARNm, substituições ou modificações de sinais de controlo de transcrição (por exemplo, promotores, operadores, potencializadoresÉ, substituições ou modificações de sinais de controlo de tradução (por exemplo, locais de ligação ao ribossoma, sequências de Shine-DalgarnoÉ, modificação de moléculas de polinucleótido para corresponder à utilização de codões da célula hospedeira, e a eliminação de sequências que desestabilizam transcritos.

Células recombinantes

A invenção fornece também uma célula recombinante, preferentemente uma célula vegetal recombinante, que é uma célula hospedeira transformada com uma ou mais moléculas recombinantes, como polinucleótidos, construções genéticas

quiméricas ou vetores recombinantes definidos no presente documento. A célula recombinante pode incluir qualquer combinação dos mesmos, como dois ou três vetores recombinantes, ou um vetor recombinante e um ou mais polinucleótidos adicionais ou ADNs quiméricos. Células apropriadas da invenção incluem quaisquer células que podem ser transformadas com um polinucleótido, ADN quimérico ou vetor recombinante descritos no presente documento, como, por exemplo, uma molécula que codifica um polipéptido ou enzima descrita no presente documento. A célula é preferentemente uma célula que é capaz de ser usada para a produção de LC-PUFA. A célula recombinante pode ser uma célula em cultura, uma célula *in vitro*, num organismo como, por exemplo, uma planta ou num órgão como, por exemplo, uma semente ou uma folha. Preferentemente, a célula está numa planta ou parte da planta, mais preferentemente na semente de uma planta.

Células hospedeiras em que polinucleótidos são introduzidos podem ser células não transformadas ou células que já são transformadas com pelo menos uma molécula de ácido nucleico. Estas moléculas de ácido nucleico podem estar relacionadas com a síntese de LC-PUFA, ou não estar relacionadas. Células hospedeiras da presente invenção podem ser endogenamente (ou seja, naturalmenteÉ capazes de produzir proteínas definidas no presente documento, em cujo caso a célula recombinante derivada da mesma tem uma melhor capacidade de produzir os polipéptidos, ou pode ser capaz de produzir essas proteínas apenas depois de ser transformada com pelo menos um polinucleótido como descrito no presente documento. Numa forma de realização, uma célula recombinante da invenção tem uma melhor capacidade de sintetizar um ácido gordo polinsaturado de cadeia longa. Como utilizado no presente documento, o termo "célula com uma capacidade melhorada de sintetizar um ácido gordo polinsaturado de cadeia longa" é um termo relativo, onde a

célula recombinante da invenção é comparada com a célula hospedeira que carece dos polinucleótidos utilizados na invenção, com a célula recombinante produzindo mais ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, ou uma maior concentração de LC-PUFA como DHA (em relação a outros ácidos gordosÉ, que a célula nativa. A célula com uma melhor capacidade de sintetizar outro produto como, por exemplo, outro ácido gordo, um lípido, um hidrato de carbono como o amido, uma molécula de ARN, um polipéptido, um produto farmacêutico ou outro produto tem um significado correspondente.

Células hospedeiras da presente invenção podem ser quaisquer células capazes de produzir pelo menos uma proteína descrita no presente documento e incluem células de bactéria, fungo (incluindo levedураÉ, parasita, artrópode, animal e vegetal. As células podem ser procarióticas ou eucarióticas. Células hospedeiras preferenciais são células de levedura e planta. Numa forma de realização preferencial, a célula vegetal é uma célula da semente, em particular, uma célula num cotilédone ou endosperma de uma semente. Numa forma de realização, a célula é uma célula animal ou uma célula de alga. A célula animal pode ser de qualquer tipo de animal como, por exemplo, uma célula de animal não humano, uma célula de vertebrados não humanos, uma célula de mamíferos não humanos ou células de animais aquáticos, como peixes ou crustáceos, invertebrados, insetos, etc. As células podem ser de um organismo apropriado para um processo de fermentação. Como usado no presente documento, o termo "processo de fermentação" refere-se a qualquer processo de fermentação ou qualquer processo que compreende uma etapa de fermentação. Exemplos de microrganismos de fermentação incluem fungos, como levedura. Como usado no presente documento, "levedura" inclui *Saccharomyces* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlbergensis*,

Candida spp., *Kluveromyces* spp., *Pichia* spp., *Hansenula* spp., *Trichoderma* spp., *Lipomyces starkey* e *Yarrowia lipolytica*. Leveduras preferenciais incluem estirpes de *Saccharomyces* spp. e em particular, *Saccharomyces cerevisiae*.

Plantas transgénicas

A invenção fornece também uma planta que compreende uma célula da invenção, como uma planta transgénica compreendendo um ou mais polinucleótidos como descritos no presente documento. O termo "planta" como usado no presente documento como um substantivo refere-se à planta inteira, mas quando usado como um adjetivo, refere-se a qualquer substância que está presente em, obtida de, derivada de, ou relacionada com uma planta, como, por exemplo, órgãos da planta (por exemplo, folhas, caules, raízes, flores), células únicas (por exemplo, pólen), sementes, células de planta e semelhantes. O termo "parte da planta" refere-se a todas as partes da planta que compreendem o ADN da planta, incluindo estruturas vegetativas, como, por exemplo, folhas ou caules, raízes, órgãos ou estruturas florais, pólen, sementes, partes de sementes como um embrião, endosperma, escutelo, ou casco da semente, tecido de planta, como, por exemplo, tecido vascular, as células e a descendência dos mesmos, desde que a parte da planta sintetize lípidos de acordo com a invenção.

Uma "planta transgénica", "planta geneticamente modificada" ou variações das mesmas refere-se a uma planta que contém uma construção génica ("transgene") não encontrada numa planta de tipo selvagem da mesma espécie, variedade ou cultivar. Plantas transgénicas, conforme definido no contexto da presente invenção, incluem plantas e seus descendentes que foram geneticamente modificados usando técnicas recombinantes para causar a produção do lípido ou pelo menos um polipéptido definidos no presente documento na planta ou órgão da planta desejado. Células de

plantas transgénicas e partes de plantas transgénicas têm significados correspondentes. Um "transgene" como referido aqui tem o significado normal na técnica da biotecnologia e inclui uma sequência genética que foi produzida ou alterada por tecnologia de ADN ou ARN recombinante e que foi introduzida numa célula da invenção, preferentemente uma célula vegetal. O transgene pode incluir sequências genéticas derivadas de uma célula vegetal que pode ser da mesma espécie, variedade ou cultivar que a célula vegetal em que o transgene é introduzido ou de outra espécie, variedade ou cultivar, ou a partir de uma célula diferente da célula vegetal. Normalmente, o transgene foi introduzido dentro da célula, como uma planta, por manipulação humana, como, por exemplo, por transformação, mas qualquer método pode ser usado de acordo com o que o perito na especialidade reconhece.

Os termos "sementes" e "grão" são usados indistintamente no presente documento. "Grão" refere-se a grão maduro como grão colhido ou grão que está ainda numa planta, mas pronto para a colheita, mas também pode referir-se ao grão após a embebição ou germinação das sementes, de acordo com o contexto. Grãos ou sementes maduras comummente têm um teor de humidade de menos de 18-20 %. "Sementes em desenvolvimento" como utilizado no presente documento refere-se a uma semente antes da maturação, normalmente encontrada nas estruturas reprodutivas da planta após a fertilização ou antese, mas pode referir-se às sementes antes da maturação, que são isoladas a partir de uma planta.

Como utilizado no presente documento, o termo "obter uma parte da planta" ou "obter uma semente" refere-se a qualquer meio de obtenção de uma parte da planta ou semente, respetivamente, incluindo a colheita das partes da planta ou sementes das plantas no campo ou em contenção, como uma estufa ou câmara de crescimento, ou por compra ou

receção de um fornecedor das partes da planta ou sementes. A semente pode ser apropriada para o plantio ou seja, capaz de germinar e produzir descendentes de plantas, ou alternativamente ser processada de tal forma que já não é capaz de germinar, por exemplo, semente rachada, polida ou moída que é útil para aplicações de alimento ou ração, ou para a extração do lípido da invenção.

Como utilizado no presente documento, o termo "órgão de armazenamento da planta" refere-se a uma parte da planta especializada para armazenar energia sob a forma de, por exemplo, proteínas, hidratos de carbono, ácidos gordos e/ou óleos. Exemplos de órgãos de armazenamento das plantas são, semente, fruto, raízes tuberosas e tubérculos. Um órgão de armazenamento da planta preferencial da invenção é a semente.

Como utilizado no presente documento, o termo "fenotipicamente normal" refere-se a uma planta ou órgão da planta geneticamente modificado, particularmente um órgão de armazenamento como sementes, tubérculos ou frutos que não têm uma capacidade significativamente reduzida de crescimento e reprodução em comparação com uma planta ou órgão da planta não modificada. Numa forma de realização, a planta ou órgão da planta geneticamente modificado que é fenotipicamente normal compreende um polinucleótido exógeno que codifica um supressor silencioso operativamente ligado a um promotor específico de órgão de armazenamento da planta e tem uma capacidade de crescer ou reproduzir que é essencialmente a mesma que uma planta ou órgão isogénico não compreendendo o dito polinucleótido. Preferentemente, a biomassa, taxa de crescimento, taxa de germinação, tamanho do órgão de armazenamento, tamanho da semente e/ou o número de sementes viáveis produzidas não é menor do que 90 % do que de uma planta carecendo do dito polinucleótido exógeno quando cultivada em condições idênticas. Este termo não inclui características da planta que podem ser diferentes

das de uma planta de tipo selvagem, mas que não afeta a utilidade da planta para fins comerciais, como, por exemplo, um fenótipo de bailarina das folhas das mudas.

As plantas fornecidas, ou previstas para a utilização na prática da presente invenção incluem monocotiledóneas e dicotiledóneas. Em formas de realização preferenciais, as plantas da presente invenção são plantas de cultivo (por exemplo, cereais e leguminosas, milho, trigo, batata, tapioca, arroz, sorgo, painço, mandioca, cevada ou ervilhaÉ, ou outros legumes. As plantas podem ser cultivadas para a produção de raízes comestíveis, tubérculos, folhas, caules, flores ou frutos. As plantas podem ser legumes ou plantas ornamentais. As plantas da invenção podem ser: milho (*Zea mays*É, canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp.É, mostarda (*Brassica juncea*É, linho (*Linum usitatissimum*É, alfafa (*Medicago sativa*É, arroz (*Oryza sativa*É, centeio (*Secale cerale*É, sorgo (*Sorghum bicolour*, *Sorghum vulgare*É, girassol (*Helianthus annus*É, trigo (*Tritium aestivum*É, soja (*Glycine max*É, tabaco (*Nicotiana tabacum*É, batata (*Solanum tuberosum*É, amendoim (*Arachis hypogaea*É, algodão (*Gossypium hirsutum*É, batata-doce (*Lopmoea batatus*É, mandioca (*Manihot esculenta*É, café (*Cofea* spp.É, coco (*Cocos nucifera*É, abacaxi (*Anana comosus*É, árvore de cítricos (*Citrus* spp.É, cacau (*Theobroma cacao*É, chá (*Camellia senensis*É, banana (*Musa* spp.É, abacate (*Persea americana*É, figo (*Ficus casica*É, goiaba (*Psidium guajava*É, manga (*Mangifer indica*É, azeitona (*Olea europaea*É, papaia (*Carica papaya*É, caju (*Anacardium occidentale*É, macadâmia (*Macadamia inter grifolia*É, amêndoa (*Prunus amygdalus*É, beterraba (*Beta vulgaris*É, aveia ou cevada.

Numa forma de realização preferencial, a planta é uma angiospérmica.

Numa forma de realização, a planta é uma planta de semente oleaginosa, preferentemente uma planta de cultivo

de semente oleaginosa. Como utilizado no presente documento, uma "planta de semente oleaginosa" é uma espécie de planta utilizada para a produção comercial de óleos das sementes da planta. A planta de semente oleaginosa pode ser colza (como canolaÉ, milho, girassol, soja, sorgo, linho (linhaçaÉ ou beterraba. Além disso, a planta de semente oleaginosa pode ser outras plantas de produção *Brassicas*, algodão, amendoim, papoula, mostarda, rícino, gergelim, cártamo ou castanha. A planta pode produzir altos níveis de óleo no seu fruto, como azeite, óleo de palma ou de coco. Plantas hortícolas que podem ser aplicadas para a presente invenção são alface, chicória ou brassicas vegetais incluindo brócolos, repolho ou couve-flor. A presente invenção pode ser aplicada a tabaco, abóboras, cenoura, morango, tomate ou pimenta.

Noutra forma de realização mais preferencial, a planta não transgénica usada para produzir uma planta transgénica da invenção produz óleo, especialmente na semente, que tem iÉ menos do que 20 %, menos do que 10 % ou menos do que 5 % de ácidos gordos 18:2 e/ou iiÉ menos do que 10 % ou menos do que 5 % de ácidos gordos 18:3.

Numa forma de realização preferencial, a planta transgénica é homozigota para cada gene que foi introduzido (transgeneÉ para que sua descendência não segregue para o fenótipo desejado. A planta transgénica também pode ser heterozigota para os transgenes introduzidos, preferentemente uniformemente heterozigota para o transgene, como, por exemplo, na descendência F1 que cresceu a partir de sementes híbridas. Essas plantas podem fornecer vantagens como vigor híbrido, bem conhecido na técnica.

Quando relevante, as plantas transgénicas podem também compreender transgenes adicionais que codificam enzimas envolvidas na produção de LC-PUFAs, como, entre outras, uma Δ6-dessaturase, uma Δ9-elongase, uma Δ8-dessaturase, uma

Δ6-elongase, uma Δ5-dessaturase, uma ω3-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ5-elongase, diacilglicerol aciltransferase, LPAAT, uma Δ17-dessaturase, uma Δ15-dessaturase e/ou uma Δ12 dessaturase. Exemplos destas enzimas com uma ou mais dessas atividades são conhecidos na técnica e incluem os descritos no presente documento. Em exemplos específicos, as plantas transgénicas pelo menos compreendem polinucleótidos exógenos que codificam:

aÉ uma Δ4-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-elongase e uma Δ6-elongase,

bÉ uma Δ4-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, a Δ8-dessaturase, uma Δ5-elongase e uma Δ9-elongase,

cÉ uma Δ4-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-elongase, uma Δ6-elongase, e uma Δ15-dessaturase,

dÉ uma Δ4-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ8-dessaturase, uma Δ5-elongase, uma Δ9-elongase, e uma Δ15-dessaturase,

eÉ uma Δ4-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-elongase, uma Δ6-elongase, e uma Δ17-dessaturase, ou

fÉ uma Δ4-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ8-dessaturase, uma Δ5-elongase, uma Δ9-elongase, e uma Δ17-dessaturase.

Numa forma de realização, os polinucleótidos exógenos codificam um conjunto de polipéptidos que são uma Δ6-dessaturase de *Pythium irregulare*, uma Δ5-dessaturase de *Thraustochytrid* ou uma Δ5-dessaturase de *Emiliana huxleyi*, uma Δ6-elongase de *Physcomitrella patens*, uma Δ5-elongase de *Thraustochytrid* ou uma Δ5-elongase de *Ostreocccus taurii*, uma ω3-dessaturase de *Phytophthora infestans* ou uma ω3-dessaturase de *Pythium irregulare* e uma Δ4-dessaturase de *Thraustochytrid*.

Numa forma de realização, as plantas da invenção são cultivadas no campo, preferentemente como uma população de

pelo menos 1.000 ou 1.000.000 plantas que são essencialmente iguais, ou numa área de pelo menos 1 hectare. Densidades de plantio diferem de acordo com as espécies de plantas, variedades de planta, clima, condições do solo, taxas de adubo e outros fatores, como conhecido na técnica. Por exemplo, a canola é normalmente cultivada numa densidade de plantação de 1,2-1,5 milhões de plantas por hectare. As plantas são colhidas como é conhecido na técnica, o que pode compreender embrulhamento, enleiramento e/ou colheita de plantas, seguido de debulha e/ou joeira do material vegetal para separar a semente do restante das partes da planta frequentemente em forma de joio. Alternativamente, as sementes podem ser colhidas a partir de plantas no campo num único processo, nomeadamente combinando.

Transformação de plantas

Plantas transgénicas podem ser produzidas usando técnicas conhecidas, como as descritas geralmente em. Slater *et al.*, Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants, Oxford University Press (2003É, e P. Christou and H. Klee, Handbook of Plant Biotechnology, John Wiley and Sons (2004É.

Como utilizado no presente documento, os termos "transformar de forma estável", "transformado de forma estável" e variações dos mesmos referem-se à integração das moléculas de ácido nucleico exógenas no genoma da célula de forma que são transferidas para as células descendentes durante a divisão celular sem a necessidade de selecionar positivamente para a sua presença. Transformantes estáveis, ou descendentes dos mesmos, podem ser selecionados por qualquer meio conhecido na técnica como *Southern blots* no ADN cromossómico ou hibridização *in situ* do ADN genómico.

A transferência mediada por *Agrobacterium* é um sistema amplamente aplicável para introduzir genes em células de planta porque o ADN pode ser introduzido em células em

tecidos vegetais completos ou órgãos ou explantes de plantas em cultura de tecidos, para expressão transiente ou para integração estável do ADN no genoma da célula vegetal. O uso de vetores de integração de planta mediados por *Agrobacterium* para introduzir ADN em células de planta é bem conhecido na técnica (veja-se, por exemplo, o documento US 5177010, US 5104310, US 5004863 ou US 5159135É incluindo métodos de imersão florais utilizando *Agrobacterium* ou outras bactérias que podem transferir ADN em células vegetais. A região do ADN a ser transferida é definida pelas sequências de fronteira e o ADN intermediário (T-ADNÉ é geralmente inserido no genoma da planta. Além disso, a integração do T-ADN é um processo relativamente preciso, resultando em alguns rearranjos. Nas variedades de plantas onde a transformação mediada por *Agrobacterium* é eficiente, é o método de escolha devido à natureza fácil e definida da transferência de genes. Vetores de transformação de *Agrobacterium* preferenciais são capazes de replicação em *E coli*, bem como *Agrobacterium*, permitindo manipulações convenientes conforme descrito (Klee *et al.*, em: Plant ADN Infectious Agents, Hohn and Schell, eds., Springer- Verlag, New York, pp. 179-203 (1985É.

Métodos de aceleração que podem ser usados incluem, por exemplo, bombardeio de microprojéteis e semelhantes. Um exemplo de um método para libertação de moléculas de ácido nucleico transformantes para células de planta é o bombardeio de microprojétil. Este método foi revisado por Yang *et al.*, Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Oxford Press, Oxford, England (1994É. Partículas não biológicas (microprojéteisÉ podem ser revestidos com ácidos nucleicos e libertados nas células por uma força propulsora. Partículas exemplares incluem aquelas compreendidas de tungsténio, ouro, platina e semelhantes. Uma vantagem particular do bombardeio de microprojétil, além de ser um meio eficaz para transformar de forma

reprodutível monocotiledóneas, é que nem o isolamento dos protoplastos, nem a suscetibilidade de infeção de *Agrobacterium* são necessários.

Noutra forma de realização alternativa, plastídeos podem ser transformados de forma estável. Métodos divulgados para transformação do plastídeo em plantas superiores incluem administração por biobalística de ADN contendo um marcador selecionável e direcionamento do ADN para o genoma do plastídeo através de recombinação homóloga (US 5.451.513, US 5.545.818, US 5.877.402, US 5.932.479 e WO99/05265É.

Outros métodos de transformação de células também podem ser usados e incluem, entre outros, a introdução de ADN em plantas por transferência direta de ADN para pólen, por injeção direta de ADN em órgãos do sistema reprodutor de uma planta ou por injeção direta de ADN nas células de embriões imaturos seguidos pela reidratação de embriões dessecados.

A regeneração, o desenvolvimento e o cultivo das plantas de transformantes de protoplastos de planta únicos ou de diferentes explantes transformados são bem conhecidos na técnica (Weissbach *et al.*, Em: Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, Calif., (1988É. Este processo de regeneração e crescimento normalmente inclui as etapas de seleção de células transformadas, cultivo dessas células individualizadas através dos habituais estágios do desenvolvimento embrionário através do estágio de mudas enraizadas. Sementes e embriões transgénicos são regenerados da mesma forma. Os brotos de raiz transgénicos resultantes são posteriormente plantados num meio de crescimento de plantas apropriado como solo.

O desenvolvimento ou a regeneração de plantas contendo o gene estranho, exógeno é bem conhecida na técnica. Preferentemente, as plantas regeneradas são autopolinizadas

para fornecer plantas transgénicas homozigotas. De outra forma, o pólen obtido a partir de plantas regeneradas é cruzado de plantas cultivadas com sementes de linhagens agronomicamente importantes. Por outro lado, o pólen das plantas destas linhagens importantes é usado para polinizar as plantas regeneradas. Uma planta transgénica da presente invenção contendo um ácido nucleico exógeno desejado é cultivada usando métodos conhecidos por um perito na especialidade.

Para confirmar a presença dos transgenes em plantas e células transgénicas, uma amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCRÉ ou análise por *Southern blot* pode ser realizada usando os métodos conhecidos pelos peritos na especialidade. Produtos de expressão dos transgenes podem ser detetados em qualquer de uma variedade de maneiras, dependendo da natureza do produto e incluindo o *Western blot* e ensaio de enzima. Uma vez que as plantas transgénicas foram obtidas, as mesmas podem ser cultivadas para a produção de tecidos de plantas ou partes com o fenótipo desejado. O tecido da planta ou partes das plantas, podem ser colhidos, e/ou as sementes recolhidas. A semente pode servir como uma fonte para cultivar plantas adicionais com tecidos ou partes com as características desejadas.

Uma planta transgénica formada com a utilização de *Agrobacterium* ou outros métodos de transformação normalmente contêm um único lócus genético num cromossoma. Estas plantas transgénicas podem ser referidas como sendo heterozigotas para os genes adicionados. Mais preferencial é uma planta transgénica que é homozigota para os genes adicionados; ou seja, uma planta transgénica que contém dois genes adicionados, um gene no mesmo lócus em cada cromossoma de um par de cromossomas. Uma planta transgénica homozigota pode ser obtida por autofertilização de uma planta transgénica hemizigótica, germinando algumas das

sementes produzidas e analisando as plantas resultantes para o gene de interesse.

Também deve ser entendido que duas plantas transgénicas diferentes que contêm dois genes ou loci exógenos segregando independentemente podem também ser cruzadas (combinadasÉ para produzir descendentes que contêm os dois conjuntos de genes ou loci. A autopolinização dos descendentes F1 apropriada pode produzir plantas que são homozigotas para os genes ou loci exógenos. O retrocruzamento para uma planta parental e fecundação cruzada com uma planta não transgénica são também contemplados, tal como o é a propagação vegetativa. Descrições de outros métodos de reprodução que são comummente usados para culturas e características diferentes podem ser encontradas em Fehr, Em: Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison Wis. (1987É.

Melhoria dos níveis de ARN exógeno e expressão estabilizada

Silenciamento de supressores

Numa forma de realização, uma célula, planta ou parte da planta da invenção compreende um polinucleótido exógeno que codifica uma proteína de supressor de silenciamento.

O silenciamento de genes pós-transcricional (PTGSÉ é um mecanismo de defesa específico de sequência de nucleótidos que pode direcionar os ARNm celulares e virais para que a degradação PTGS ocorra em plantas ou fungos transformados com ADN estranho (heterólogoÉ ou endógeno de forma estável ou transiente e resulta na acumulação reduzida de moléculas de ARN com semelhança de sequência com o ácido nucleico introduzido.

Foi amplamente considerado que a coexpressão de um supressor de silenciamento com um transgene de interesse irá aumentar os níveis do ARN presente na célula transcrita do transgene. Enquanto isto foi provado como sendo verdadeiro para células *in vitro*, efeitos secundários

significativos foram observados em muitos estudos de coexpressão em plantas inteiras. Mais especificamente, conforme descrito em Mallory *et al.* (2002É, Chapman *et al.* (2004É, Chen *et al.* (2004É, Dunoyer *et al.* (2004É, Zhang *et al.* (2006É, Lewsey *et al.* (2007É e Meng *et al.* (2008É, as plantas que expressam supressores de silenciamento, geralmente sob promotores constitutivos, são muitas vezes fenotipicamente anormais na medida em que não são úteis para a produção comercial.

Recentemente, verificou-se que os níveis de molécula de ARN podem ser aumentados, e/ou níveis de molécula de ARN estabilizados ao longo de inúmeras gerações, pela limitação da expressão do supressor de silenciamento para uma semente de uma planta ou parte da mesma (WO2010/057246É. Como utilizado no presente documento, uma "proteína supressora do silenciamento" ou SSP é qualquer polipéptido que pode ser expresso numa célula vegetal que melhora o nível de produto de expressão de um transgene diferente na célula vegetal, particularmente ao longo de gerações repetidas da planta inicialmente transformada. Numa forma de realização, a SSP é um supressor de silenciamento viral ou mutante do mesmo. Um grande número de supressores de silenciamento virais é conhecido na técnica e incluem, entre outros, P19, V2, P38, Pe-Po e RPV-P0. Numa forma de realização, o supressor de silenciamento viral compreende aminoácidos com uma sequência, conforme fornecido em qualquer uma das SEQ ID NOs 53 a 57, um fragmento biologicamente ativo da mesma, ou uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 50 % idêntica a qualquer uma ou mais das SEQ ID NOs 53 a 57 e que tem atividade como um supressor de silenciamento.

Como utilizado no presente documento, os termos "expressão de estabilização", "expresso de forma estável", "expressão estabilizada" e variações dos mesmo, referem-se ao nível da molécula de ARN sendo essencialmente o mesmo ou mais elevado na plantas descendentes ao longo de gerações

repetidas, por exemplo pelo menos três, pelo menos cinco ou pelo menos 10 gerações, quando comparado com as plantas isogénicas carecendo do polinucleótido exógeno que codifica o supressor de silenciamento. No entanto, estes termos não excluem a possibilidade de que ao longo de gerações repetidas exista alguma perda de níveis da molécula de ARN em comparação a uma geração anterior, por exemplo, não menos do que uma perda de 10 % por geração.

O supressor pode ser selecionado de qualquer fonte, por exemplo, de planta, vírus, mamífero etc. Veja-se o documento WO2010/057246 para obter uma lista de vírus dos quais o supressor pode ser obtido e a proteína (por exemplo, B2, P14 etcÉ ou designação da região de codificação para o supressor de cada vírus particular. Várias cópias de um supressor podem ser usadas. Supressores diferentes podem ser usados juntos (por exemplo, em tandemÉ.

Moléculas de ARN

Essencialmente qualquer molécula de ARN que é desejável para ser expressa numa semente de planta pode ser coexpressa com o supressor de silenciamento. Os polipéptidos codificados podem estar envolvidos no metabolismo de óleo, amido, hidratos de carbono, nutrientes, etc., ou podem ser responsáveis pela síntese de proteínas, péptidos, ácidos gordos, lípidos, ceras, óleos, amidos, açúcares, hidratos de carbono, sabores, odores, toxinas, carotenoides, hormonas, polímeros, flavonoides, proteínas de armazenamento, ácidos fenólicos, alcaloides, ligninas, taninos, celuloses, glicoproteínas, glicolípidos, etc, preferentemente a biossíntese ou montagem do TAG.

Num exemplo particular, as plantas produziram aumento dos níveis de enzimas para a produção de óleo em plantas como *Brassicas*, por exemplo, canola ou girassol, algodão, linho, cártamo, soja, *Camelina* ou milho.

Níveis de LC-PUFA produzidos

Os níveis de LC-PUFA ou combinação de LC-PUFAs que são produzidos na parte recombinante da célula ou planta como sementes são de importância. Os níveis podem ser expressos como uma composição (em percentagemÉ do ácido gordo total que é um LC-PUFA particular ou grupo de LC-PUFA relacionados, por exemplo, o LC-PUFA ω3 ou o LC-PUFA ω6, ou o VLC-PUFA ou outro que pode ser determinado por métodos conhecidos na técnica. O nível também pode ser expresso como um teor de LC-PUFA como, por exemplo, a percentagem de LC-PUFA no peso seco do material compreendendo as células recombinantes, por exemplo, a percentagem do peso da semente que é LC-PUFA. Será apreciado que o LC-PUFA que é produzido numa semente oleaginosa pode ser consideravelmente superior em termos de teor de LC-PUFA num legume ou um grão que não é cultivado para a produção de óleo, mas ambos podem ter composições de LC-PUFA semelhantes, e podem ser usados como fontes de LC-PUFA para consumo humano ou animal.

Os níveis de LC-PUFA podem ser determinados por qualquer um dos métodos conhecidos na técnica. Num método preferencial, lípidos totais são extraídos das células, tecidos ou organismos e o ácido gordo convertido em ésteres metílicos antes da análise por cromatografia gasosa (GCÉ. Estas técnicas são descritas no Exemplo 1. A posição do pico no cromatograma pode ser usada para identificar cada ácido gordo particular, e a área sob cada pico integrada para determinar a quantidade. Como utilizado no presente documento, salvo se indicado o contrário, a percentagem de ácidos gordos particulares numa amostra é determinado como a área sob o pico para o ácido gordo como uma percentagem da área total de ácidos gordos no cromatograma. Isto corresponde essencialmente a uma percentagem em peso (p/pÉ. A identidade de ácidos gordos pode ser confirmada por GC-MS. Os lípidos totais podem ser separados por técnicas

conhecidas para purificar frações como a fração TAG. Por exemplo, cromatografia de camada fina (TLCÉ pode ser realizada numa escala analítica para separar TAG de outras frações lipídicas como DAG, acil-CoAs ou fosfolípidos a fim de determinar a composição de ácidos gordos especificamente de TAG.

Numa forma de realização, a soma total de ARA, EPA, DPA e DHA nos ácidos gordos no lípido extraído é entre cerca de 7 % e cerca de 25 % dos ácidos gordos totais na célula. Noutra forma de realização, o ácido gordo total na célula tem menos do que 1 % de C20:1. Em formas de realização preferenciais, o TAG extraível na célula compreende os ácidos gordos nos níveis referidos no presente documento. Cada combinação possível das características definindo o lípido conforme descrito no presente documento é também incluída.

O nível de produção de LC-PUFA na célula recombinante, planta ou parte da planta como a semente também pode ser expresso como uma percentagem de conversão de um substrato específico de ácidos gordos para um ou mais produtos ácidos gordos, que é também referido no presente documento como uma "eficiência de conversão" ou "eficiência enzimática". Este parâmetro é baseado na composição de ácidos gordos nos lípidos extraídos da célula, planta, parte da planta ou semente, ou seja, a quantidade de LC-PUFA formada (incluindo outro LC-PUFA derivado desseÉ como uma percentagem de um ou mais ácidos gordos de substrato (incluindo todos os outros ácidos gordos derivados desseÉ. A fórmula geral para uma percentagem de conversão é: 100 x (a soma das percentagens do produto LC-PUFA e todos os produtos derivados dessesÉ/(a soma das percentagens do ácido gordo substrato e todos os produtos derivados dessesÉ. No que se refere a DHA, por exemplo, pode ser expresso como a razão entre o nível de DHA (como uma percentagem do teor total de ácidos gordos no lípidoÉ para

o nível de um ácido gordo de substrato (por exemplo, OA, LA, ALA, SDA, ETA ou EPAÉ e todos os produtos diferentes de DHA derivados do substrato. A percentagem de conversão ou a eficiência de conversão pode ser expressa para uma única etapa enzimática numa via, ou para parte ou a totalidade de uma via.

As eficiências de conversão específicas são calculadas no presente documento de acordo com as fórmulas:

1. OA para DHA = 100 x (%DHAÉ/(% de soma para OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA e DHAÉ.
2. LA para DHA = 100 x (%DHAÉ/(% de soma para LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA e DHAÉ.
3. ALA para DHA = 100 x (%DHAÉ/(% de soma para ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA e DHAÉ.
4. EPA para DHA = 100 x (%DHAÉ/(% de soma para EPA, DPA e DHAÉ.
5. DPA para DHA (eficiência de Δ4-dessaturaseÉ = 100 x (%DHAÉ/(% de soma para DPA e DHAÉ.
6. Eficiência de Δ12-dessaturase = 100 x (% de soma para LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA e DHAÉ/ (% de soma para OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA e DHAÉ.
7. Eficiência de ω3-dessaturase = 100 x (% de soma para ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA e DHAÉ/(% de soma para LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA e DHAÉ.
8. OA para ALA = 100 x (% de soma para ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA e DHAÉ/(% de soma para OA, LA, GLA, DGLA, ARA, EDA, ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA e DHAÉ.
9. Eficiência Δ6-dessaturase (em substrato ω3 ALAÉ = 100 x (% de soma para SDA, ETA, EPA, DPA e DHAÉ/(ALA, SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA e DHAÉ.
10. Eficiência de Δ6-elongase (em substrato ω3 SDAÉ = 100 x (% de soma para ETA, EPA, DPA e DHAÉ/ (% de soma para

SDA, ETA, EPA, DPA e DHAÉ.

11. Eficiência de Δ5-dessaturase (em substrato ω3 ETAÉ = 100 x (% de soma para EPA, DPA e DHAÉ/ (% de soma para ETA, EPA, DPA e DHAÉ.

12. Eficiência de Δ5-elongase (em substrato ω3 EPAÉ = 100 x (% de soma para DPA e DHAÉ/ (% de soma para EPA, DPA e DHAÉ.

A composição de ácidos gordos do lípido, preferentemente óleo da semente, da invenção, também se caracteriza pela razão de ácidos gordos ω6:ácidos gordos ω3 no teor total de ácidos gordos, tanto para ácidos gordos ω6 totais: ácidos gordos ω3 totais ou para novos ácidos gordos ω6:novos ácidos gordos ω3. Os termos ácidos gordos ω6 totais, ácidos gordos ω3 totais, novos ácidos gordos ω6 e novos ácidos gordos ω3 têm os significados conforme definidos no presente documento. As razões são calculadas a partir da composição de ácidos gordos nos lípidos extraídos da célula, planta, parte da planta ou semente, da forma exemplificada no presente documento. É desejável ter um nível maior de ácidos gordos ω3 do que ω6 nos lípidos e, portanto, uma razão ω6:ω3 inferior a 1,0 é preferencial. Uma razão de 0,0 indica uma ausência completa do ácido gordo ω6 definido; uma razão de 0,03 foi alcançada conforme descrito no Exemplo 6. Estas baixas razões podem ser conseguidas através da utilização combinada de uma Δ6-dessaturase, que tem uma preferência por substrato de ω3 juntamente com uma ω3-dessaturase, particularmente uma ω3-dessaturase de fungo como ω3-dessaturase de *Pichia* pastoris como exemplificado no presente documento.

O rendimento de LC-PUFA por peso de sementes também pode ser calculado com base no teor total de óleo na semente e a %DHA no óleo. Por exemplo, se o teor de óleo de semente de canola é de cerca de 40 % (p/pÉ e cerca de 12 % do teor total de ácidos gordos do óleo é DHA, o teor de DHA das sementes é cerca de 4,8 %, ou cerca de 48 mg por grama

de semente. Conforme descrito no Exemplo 2, o teor DHA de sementes de *Arabidopsis* com cerca de 9 % DHA, que tem um menor teor de óleo de canola, foi cerca de 25 mg/g de semente. Num teor de DHA de cerca de 7 %, sementes de canola ou sementes de *Camelina sativa* têm um teor de DHA de cerca de 28 mg por grama de semente. A presente invenção fornece, portanto, plantas *Brassica napus*, *B. juncea* e *Camelina sativa* e sementes obtidas a partir dessas, compreendendo pelo menos cerca de 28 mg de DHA por grama de semente. A semente tem um teor de humidade como padrão para a semente madura colhida após a secagem (4-15 % de humidadeÉ. A invenção também fornece um processo para a obtenção de óleo, compreendendo a obtenção da semente e extração do óleo da semente, e utilizações do óleo e métodos para obter a semente compreendendo a colheita das sementes das plantas de acordo com a invenção.

A quantidade de DHA produzido por hectare também pode ser calculada se o rendimento de sementes por hectare for conhecido ou pode ser estimada. Por exemplo, a canola na Austrália normalmente produz cerca de 2,5 toneladas de sementes por hectare, o que a um teor de 40 % de óleo, produz cerca de 1000 kg de óleo. A 12 % de DHA no óleo total, isto proporciona cerca de 120 kg de DHA por hectare. Se o teor de óleo for reduzido em 50 %, isto ainda fornece cerca de 60 kg de DHA/ha.

As evidências até agora sugerem que algumas dessaturases expressas de forma heteróloga em levedura ou plantas têm relativamente baixa atividade em combinação com algumas elongases. Isto pode ser aliviado fornecendo uma dessaturase com a capacidade de usar uma forma de acil-CoA do ácido gordo como substrato na síntese de LC-PUFA, e imagina-se que isso seja vantajoso em células recombinantes, particularmente em células vegetais. Uma combinação particularmente vantajosa para a síntese de DHA eficiente é uma ω3-dessaturase de fungo, por exemplo, como

a ω3-dessaturase de *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 12É, com uma Δ6-dessaturase, que tem uma preferência para substratos de acilo ω3 como, por exemplo, a Δ6-dessaturase de *Micromonas pusilla* (SEQ ID NO: 13É, ou variantes das mesmas que têm pelo menos 95 % de identidade de sequência de aminoácidos.

Como utilizado no presente documento, o termo "essencialmente livre" significa que a composição (por exemplo, óleo ou lípidoÉ compreende pouco (por exemplo, menos do que cerca de 0,5 %, menos do que cerca de 0,25 %, menos do que cerca de 0,1 %, ou menos do que cerca de 0,01 %É ou nenhum do componente definido. Numa forma de realização, "essencialmente livre" significa que o componente é indetetável usando uma técnica analítica de rotina, por exemplo, um ácido gordo específico (como o ácido ω6-docosapentaenoicoÉ não pode ser detetado usando cromatografia de gás, conforme descrito no Exemplo 1.

Produção de óleos

Técnicas que são rotineiramente praticadas podem ser usadas para extrair, processar e analisar os óleos produzidos por células, plantas, sementes, etc da presente invenção. Normalmente, as sementes da planta são cozidas, pressionadas e submetidas a extração para produzir óleo bruto, que é então degomado, refinado, branqueado e desodorizado. No geral, técnicas para triturar as sementes são conhecidas. Por exemplo, sementes oleaginosas podem ser temperadas pulverizando as mesmas com água para aumentar a humidade para, por exemplo, 8,5 %, e cobrir com flocos usando um rolo liso com uma configuração de lacuna de 0,23 a 0,27 mm. Dependendo do tipo de semente, a água pode não ser adicionada antes da trituração. A aplicação de calor desativa as enzimas, facilita a rutura de células novas, aglutina as gotículas de óleo e aglomera as partículas de proteína, todos os quais facilitam o processo de extração.

Numa forma de realização, a maior parte do óleo da

semente é libertado pela passagem através de uma prensa de rosca. Os bolos expelidos da prensa de rosca são então extraídos por solvente, por exemplo, com hexano, usando uma coluna de calor rastreado. Alternativamente, o óleo bruto produzido pela operação de prensagem pode ser passado através de um tanque de decantação com uma tampa de drenagem de arame com fenda para remover os sólidos que são expressos com o óleo durante a operação de prensagem. O óleo clarificado pode ser passado através de um filtro de placa e quadro para remover quaisquer partículas sólidas finas remanescentes. Se desejado, o óleo recuperado do processo de extração pode ser combinado com o óleo clarificado para produzir um óleo bruto misturado.

Uma vez que o solvente é retirado do óleo bruto, as partes prensadas e extraídas são combinadas e submetidas a procedimentos de processamento de óleo normais. Como utilizado no presente documento, o termo "purificado" quando usado em conexão com lípidos ou óleo da invenção, normalmente significa que o lípido ou óleo extraído foi submetido a uma ou mais etapas de processamento para aumentar a pureza do componente lípido/óleo. Por exemplo, uma etapa de purificação pode compreender um ou mais ou todos do grupo que consiste em: degomagem, desodorização, descoloração, secagem e/ou fracionamento do óleo extraído. No entanto, como utilizado no presente documento, o termo "purificado" não inclui um processo de transesterificação ou outro processo que altera a composição dos ácidos gordos do lípido ou óleo da invenção para aumentar o teor de DHA como uma percentagem do teor de ácidos gordos total. Expresso por outras palavras, a composição de ácido gordo do lípido ou óleo purificado é essencialmente a mesma do lípido ou óleo impuro.

Degomagem

A degomagem é uma etapa inicial na refinação de óleos e o seu principal objetivo é a remoção da maior parte dos

fosfolípidos do óleo, que podem estar presentes como aproximadamente 1-2 % do lípido total extraído. A adição de ~2 % de água, normalmente contendo ácido fosfórico, a 70-80 °C ao óleo bruto resulta na separação da maioria dos fosfolípidos acompanhados por metais vestigiais e pigmentos. O material insolúvel que é removido é principalmente uma mistura de fosfolípidos e trigliceróis e é também conhecido como lecitina. A degomagem pode ser realizada pela adição de ácido fosfórico concentrado para o óleo da semente bruto para converter fosfatídeos não hidratáveis na forma hidratável, e para quelar metais menores que estão presentes. A goma é separada do óleo da semente por centrifugação.

Refinamento alcalino

O refinamento alcalino é um dos processos de refinação para tratamento de óleo bruto, por vezes também referido como neutralização. Geralmente segue-se a degomagem e precede o branqueamento. Após a degomagem, o óleo da semente pode ser tratado pela adição de uma quantidade suficiente de uma solução de álcalis para titular todos os ácidos gordos e ácidos fosfóricos e remover os sabões assim formados. Materiais alcalinos apropriados incluem hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, carbonato de sódio, hidróxido de lítio, hidróxido de cálcio, carbonato de cálcio e hidróxido de amónio. Este processo normalmente é realizado à temperatura ambiente e remove a fração de ácido gordo livre. O sabão é removido por centrifugação ou por extração num solvente para o sabão, e o óleo neutralizado é lavado com água. Se necessário, quaisquer álcalis em excesso no óleo podem ser neutralizados com um ácido apropriado como ácido clorídrico ou ácido sulfúrico.

Branqueamento

O branqueamento é um processo de refinação no qual os óleos são aquecidos a 90-120 °C durante 10-30 minutos na presença de uma terra de branqueamento (0,2-2,0 %É e na

ausência de oxigénio operando com azoto ou vapor ou no vácuo. Esta etapa no processamento de óleo é projetada para remover os pigmentos indesejados (carotenoides, clorofila, gossipol, etcÉ, e o processo também remove produtos de oxidação, metais vestigiais, compostos de enxofre e vestígios de sabão.

Desodorização

A desodorização é um tratamento de óleos e gorduras a uma temperatura alta (200-260 °CÉ e baixa pressão (0,1-1 mmHgÉ. Isto geralmente é conseguido através da introdução de vapor para o óleo de semente a uma taxa de cerca de 0,1 ml/minuto/100 ml de óleo de semente. Após cerca de 30 minutos de aspersão, o óleo de semente é arrefecido sob vácuo. O óleo de semente é normalmente transferido para um recipiente de vidro e lavado com árgon antes de ser armazenado sob refrigeração. Este tratamento melhora a cor do óleo de semente e remove a maioria das substâncias voláteis ou compostos odoríferos, incluindo quaisquer ácidos gordos livres remanescentes, monoacilgliceróis e produtos de oxidação.

Fregelização

A fregelização é um processo por vezes utilizado na produção comercial de óleos para a separação dos óleos e gorduras sólidas (estearinaÉ e frações de líquido (oleínaÉ por cristalização em temperaturas subambientes. Foi aplicado originalmente ao óleo de semente de algodão para produzir um produto livre de sólidos. Normalmente é usado para diminuir o teor de ácidos gordos saturados dos óleos.

Transesterificação

A transesterificação é um processo que troca os ácidos gordos dentro e entre TAGs ou transfere os ácidos gordos para outro álcool para formar um éster, inicialmente pela libertação de ácidos gordos dos TAGs como ácidos gordos livres ou como ésteres de ácidos gordos, normalmente ésteres metílicos ou etílicos. Quando combinado com um

processo de fracionamento, a transesterificação pode ser usada para modificar a composição de ácidos gordos de lípidos (Marangoni *et al.*, 1995É. A transesterificação pode usar meios químicos (por exemplo, ácido forte ou base catalisadaÉ ou enzimáticos, este último utilizando lipases que podem ser específicas de posição (específicas de *sn*-1/3 ou *sn*-2É para o ácido gordo no TAG, ou com uma preferência por alguns ácidos gordos em relação aos outros (Speranza *et al.*, 2012É. O fracionamento de ácidos gordos para aumentar a concentração de LC-PUFA num óleo pode ser alcançado por qualquer um dos métodos conhecidos na técnica como, por exemplo, cristalização por congelamento, formação de complexos usando ureia, destilação molecular, extração de fluido supercrítico e complexantes de iões de prata. A formação de complexos com ureia é um método preferencial pela sua simplicidade e eficiência na redução do nível de ácidos gordos saturados e monoinsaturados no óleo (Gamez *et al.*, 2003É. Inicialmente, os TAGs do óleo dividem-se nos seus ácidos gordos constituintes, muitas vezes sob a forma de ésteres de ácidos gordos, por hidrólise sob quaisquer condições de reação catalisada por ácido ou base, pelo qual uma mol de TAG é submetida a reação com pelo menos 3 moles de álcool (por exemplo, o etanol para ésteres etílicos ou metanol para ésteres metílicosÉ com excesso de álcool utilizado para permitir a separação dos ésteres alquílicos formados e o glicerol que também é formado, ou por lipases. Estes ácidos gordos livres ou ésteres de ácidos gordos, que são geralmente inalterados na composição de ácidos gordos pelo tratamento, podem então ser misturados com uma solução etanólica de ureia para formação do complexo. Os ácidos gordos saturados e monoinsaturados facilmente formam complexos com a ureia e cristalizam-se com o arrefecimento e posteriormente podem ser removidos por filtração. A fração complexada não ureia é, desse modo, enriquecida com LC-PUFA.

Produtos alimentares

O presente pedido descreve composições que podem ser usadas como produtos alimentares. Para fins da presente invenção, "produtos alimentares" ou "géneros alimentícios" incluem qualquer alimento ou preparação para consumo humano ou animal que, quando tomadas pelo corpo (aÉ servem para nutrir ou desenvolver tecidos ou fornecer energia; e/ou (bÉ manter, restaurar ou suportar um estado nutricional ou função metabólica apropriados. Os produtos alimentares ou géneros alimentícios produzidos de acordo com a invenção incluem composições nutricionais para bebés e/ou crianças pequenas, como, por exemplo, fórmula infantil e farinha de sementes da invenção.

Os produtos alimentares ou géneros alimentícios produzidos de acordo com invenção compreendem, por exemplo, uma célula da invenção, uma planta da invenção, a parte da planta da invenção, a semente da invenção, um extrato da invenção, o produto do método da invenção, o produto do processo de fermentação como descrito no presente documento, ou uma composição juntamente com veículos apropriados. O termo "veículo" é usado no seu sentido mais lato para incluir qualquer componente que pode ou não ter valor nutricional. Como o especialista irá apreciar, o veículo deve ser apropriado para utilização (ou utilizado numa concentração suficientemente baixaÉ num produto alimentar de forma que não tenha efeitos prejudiciais sobre o organismo que consome o produto alimentar.

Os produtos alimentares ou géneros alimentícios produzidos de acordo com a presente invenção compreendem um óleo, éster de ácido gordo ou ácido gordo produzidos direta ou indiretamente pela utilização de métodos, células ou plantas divulgadas no presente documento. A composição pode estar sob a forma sólida ou líquida. Adicionalmente, a composição pode incluir macronutrientes comestíveis, proteínas, hidratos de carbono, vitaminas, e/ou minerais em

quantidades desejadas para uma utilização particular. As quantidades destes ingredientes irão variar dependendo se a composição é destinada para utilização com indivíduos normais ou para utilização com indivíduos com necessidades especiais, como os indivíduos que sofrem de distúrbios metabólicos e semelhantes.

Exemplos de veículos apropriados com valor nutritivo incluem, entre outros, macronutrientes como hidratos de carbono, proteínas e gorduras comestíveis. Exemplos destas gorduras comestíveis incluem, entre outros, óleo de coco, óleo de borragem, óleo de fungo, óleo de groselha preta, óleo de soja e mono e diglicéridos. Exemplos destes hidratos de carbono são (entre outrosÉ: glicose, lactose comestível e amido hidrolisado. Adicionalmente, exemplos de proteínas que podem ser utilizadas na composição nutricional descrita no presente documento incluem (entre outrasÉ proteínas de soja, soro de leite eletrodialisado, leite desnatado eletrodialisado, soro de leite ou os hidrolisados destas proteínas.

Em relação a vitaminas e minerais, os seguintes podem ser adicionados às composições de produto alimentar ou género alimentício produzidas de acordo com a presente invenção: cálcio, fósforo, potássio, sódio, cloreto, magnésio, manganês, ferro, cobre, zinco, selénio, iodo e vitaminas A, E, D, C e o complexo B. Outras vitaminas e minerais também podem ser adicionados.

Os componentes utilizados nas composições de produto alimentar ou género alimentício produzidas de acordo com a presente invenção podem ser de origem semipurificada ou purificada. Por semipurificado ou purificado entende-se um material que foi preparado por purificação de um material natural ou por síntese *de novo*.

Um produto alimentar ou género alimentício produzido de acordo com a presente invenção também pode ser adicionado aos alimentos mesmo quando a suplementação da

dieta não é necessária. Por exemplo, a composição pode ser adicionada aos alimentos de qualquer tipo, incluindo (entre outrosÉ: margarina, manteiga modificada, queijos, leite, iogurte, chocolate, doces, aperitivos, óleos de salada, óleos para cozinhar, gorduras para cozinhar, carnes, peixes e bebidas.

O género *Saccharomyces* spp é usado na fermentação de cerveja e vinho e também como um agente no cozimento, particularmente no pão. Outras leveduras como leveduras oleaginosas incluindo, por exemplo, *Yarrowia* spp, também são úteis na produção de LC-PUFA. Leveduras podem ser utilizadas como aditivo em alimentos para animais, como na aquicultura. Será evidente podem ser fornecidas estirpes de leveduras geneticamente modificadas que são adaptadas para sintetizar o LC-PUFA, conforme descrito no presente documento. Estas estirpes de leveduras, ou LC-PUFA produzidos pelas mesmas, podem ser depois utilizados em produtos alimentares e na preparação de vinho e cerveja para fornecer produtos que têm um teor de ácidos gordos melhorado.

Adicionalmente, os ácidos gordos produzidos de acordo com a presente invenção ou células hospedeiras transformadas para conter e expressar os genes em questão também podem ser usados como suplementos alimentares para animais para alterar a composição de ácidos gordos nos tecidos, ovos ou leite dos animais para uma mais desejável para consumo humano ou animal. Exemplos destes animais incluem ovelhas, gado, cavalos, aves como galinhas e semelhantes.

Além disso, os produtos alimentares produzidos de acordo com a invenção podem ser usados em aquicultura para aumentar os níveis de ácidos gordos em peixes ou crustáceos, como, por exemplo, camarões para consumo humano ou animal. Peixes preferenciais são o salmão.

Produtos alimentares ou géneros alimentícios

preferidos produzidos de acordo com a invenção são as plantas, sementes e outras partes das plantas, como folhas e caules, que podem ser usadas diretamente como alimento ou ração para os humanos ou outros animais. Por exemplo, os animais podem pastar diretamente sobre tais plantas cultivadas no campo ou serem alimentados com quantidades mais medidas numa alimentação controlada. A invenção inclui a utilização destas plantas e partes de plantas como alimento para aumentar os níveis de LC-PUFA em seres humanos e outros animais.

Composições

O presente pedido também descreve composições, particularmente composições farmacêuticas, compreendendo um ou mais dos ácidos gordos e/ou óleos resultantes produzidos usando os métodos da invenção.

Uma composição farmacêutica pode compreender um ou mais dos ácidos gordos e/ou óleos, em combinação com um veículo, adjuvante ou portador padrão, bem conhecido, não tóxico farmaceuticamente aceitável, como solução salina de tampão fosfato, água, etanol, polióis, óleos vegetais, um agente humectante ou uma emulsão como uma emulsão de água/óleo. A composição pode estar sob a forma sólida ou líquida. Por exemplo, a composição pode ser sob a forma de um comprimido, cápsula, líquido ingerível ou em pó, injetável, ou pomada tópica ou creme. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pela manutenção da granulometria necessária em caso de dispersões e pela utilização de tensioativos. Também pode ser desejável incluir agentes isotonizantes, por exemplo, açúcares, cloreto de sódio e semelhantes. Além destes diluentes inertes, a composição também pode incluir adjuvantes, como agentes humectantes, emulsionantes e agentes de suspensão, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes e agentes perfumantes.

Suspensões, além dos compostos ativos, podem

compreender agentes de suspensão, como, por exemplo, álcoois isoestearílicos etoxilados, polioxietileno sorbitol e ésteres de sorbitano, celulose microcristalina, metahidróxido de alumínio, bentonite, ágar-ágar e tragacanto e misturas dos mesmos.

Formas farmacêuticas sólidas como comprimidos e cápsulas podem ser preparadas utilizando técnicas bem conhecidas. Por exemplo, os ácidos gordos produzidos de acordo com a presente invenção podem ser comprimidos com bases de comprimidos convencionais como a lactose, sacarose e amido de milho em combinação com ligantes como acácia, amido de milho ou gelatina, agentes desintegrantes como o amido de batata ou ácido algínico e um lubrificante como ácido esteárico ou estearato de magnésio. As cápsulas podem ser preparadas incorporando estes excipientes dentro de uma cápsula de gelatina juntamente com antioxidantes e os ácidos gordos relevantes.

Para administração intravenosa, os ácidos gordos produzidos de acordo com a presente invenção ou derivados dos mesmos podem ser incorporados em formulações comerciais.

Uma dose típica de um ácido gordo particular é de 0,1 mg a 20 g, tomado de uma a cinco vezes por dia (até 100 g diariamenteÉ e é preferentemente no intervalo de cerca de 10 mg a cerca de 1, 2, 5, ou 10 g diariamente (tomado numa ou várias dosesÉ. Como conhecido na técnica, um mínimo de cerca de 300 mg/dia de ácidos gordos, especialmente LC-PUFA, é desejável. No entanto, será apreciado que qualquer quantidade de ácido gordo será benéfica para o indivíduo.

Possíveis vias de administração das composições farmacêuticas descritas no presente documento incluem, por exemplo, entérica (por exemplo, oral e retalÉ e parentérica. Por exemplo, uma preparação líquida pode ser administrada por via oral ou por via retal. Adicionalmente, uma mistura homogénea pode ser completamente dispersa em

água, misturada em condições estéreis com diluentes, conservantes, tampões ou propulsores fisiologicamente aceitáveis para formar um inalante ou pulverização.

A dosagem da composição a ser administrada ao paciente pode ser determinada por um perito na especialidade e depende de vários fatores como o peso do paciente, idade do paciente, saúde geral do paciente, histórico do paciente, estado imunitário do paciente, etc.

Além disso, as composições descritas no presente documento podem ser utilizadas para fins cosméticos. Podem-se ser acrescentadas a composições cosméticas pré-existentes de modo que é formada uma mistura ou um ácido gordo produzido de acordo com o pedido em questão pode ser usado como o único ingrediente "ativo" numa composição cosmética.

EXEMPLOSÓ

ExemploÓ1.ÓMateriaisÓeÓmétodosÓ

Expressão de genes em células vegetais num sistema de expressão transiente

Construções genéticas exógenas foram expressas em células vegetais num sistema de expressão transiente essencialmente como descrito por Voinnet *et al.* (2003É e Wood *et al.* (2009É. Os plasmídeos contendo uma região de codificação a ser expressa a partir de um promotor constitutivo forte como o promotor CaMV 35S foram introduzidos na estirpe AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens*. Um gene quimérico 35S:p19 para expressão do supressor de silenciamento viral p19 foi introduzido separadamente em AGL1, conforme descrito no documento WO 2010/057246. As células de *Agrobacterium* recombinantes foram cultivadas a 28 °C em caldo LB suplementado com canamicina a 50 mg/l e rifampicina a 50 mg/l até à fase estacionária. As bactérias foram então sedimentadas por centrifugação a 5000 g durante 15 minutos à temperatura ambiente antes de serem novamente suspensas até DO600 = 1,0 num tampão de infiltração

contendo MES a 10 mM pH 5,7, $MgCl_2$ a 10 mM e acetosiringona a 100 μM. As células foram então incubadas a 28 °C com agitação durante 3 horas antes dos volumes iguais de culturas de *Agrobacterium* contendo 35S:p19 e as construções quiméricas de teste de interesse serem misturadas antes da infiltração do tecido foliar. As plantas cresceram de forma típica durante mais cinco dias após infiltração antes dos discos das folhas serem removidos e secos por congelação para análise de GC dos ácidos gordos.

Ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME) dos lípidos totais da folha em amostras liofilizadas foram produzidos incubando as amostras em solução de metanol/HCl/diclorometano (10/1/1 v/v) durante 2 horas a 80 °C, juntamente com uma quantidade conhecida de ácido hexadecanoico como padrão interno. FAMEs foram extraídos em hexano/DCM, concentrados num pequeno volume em hexano e injetados num GC. A quantidade de ácidos gordos individuais e totais presentes nas frações lipídicas foi quantificada com base na quantidade conhecida de padrão interno.

Análise de cromatografia gasosa (GC) de ácidos gordos

FAME foram analisados por cromatografia gasosa, utilizando um Agilent Technologies 7890A GC (Palo Alto, California, EUA) equipado com uma coluna de 30 m SGE-BPX70 (70 % cianopropil polisilfenileno-siloxano, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 mm de espessura de película), um FID, um injetor *split/splitless* (com e sem divisão da amostra) e um amostrador automático Agilent Technologies 7693 Series e injetor. Hélio foi usado como gás portador. As amostras foram injetadas em modo de divisão (razão 50:1) a uma temperatura de forno de 150 °C. Após a injeção, a temperatura do forno foi mantida a 150 °C durante 1 min. e então elevada para 210 °C a 3 $°C.min^{-1}$, novamente elevada a 240 °C a 50 $°C.min^{-1}$ e finalmente mantida durante 1,4 min a 240 °C. Os picos foram quantificados com o *software* Agilent Technologies ChemStation (Rev B.04.03 (16), Palo Alto,

California, EUAÉ com base na resposta da quantidade conhecida do padrão externo GLC-411 (NucheckÉ e padrão interno C17:0-ME.

Análise de cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MSÉ de lípidos

Os lípidos totais foram extraídos de sementes em desenvolvimento liofilizadas, doze dias após a floração (dafÉ e de sementes maduras após a adição de uma quantidade conhecida de tri-C17:0-TAG como um padrão de quantificação interna. Os lípidos extraídos foram dissolvidos em 1 ml de hidroxitolueno butilado a 10 mM em butanometanol (1:1 v/vÉ por 5 mg de material seco e analisados utilizando um Agilent 1200 series LC e 6410b ionização por eletropulverização de triplo quadripolo LC-MS. Os lípidos foram cromatograficamente separados usando uma coluna Ascentis Express RP-Amide (50 mm x 2,1 mm, 2,7 µm, SupelcoÉ operando um gradiente binário com uma taxa de fluxo de 0,2 ml/min. As fases móveis foram: A. formiato de amónio a 10 mM em H_2O:metanol:tetrahidrofurano (50:20:30 v/v/vÉ; B. formiato de amónio a 10 mM em H_2O:metanol:tetrahidrofurano (5:20:75, v/v/vÉ. As listas de monitorização de reações múltiplas (MRMÉ basearam-se nos seguintes ácidos gordos principais: 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 18:4, 20:1, 2:20, 20:3, 4:20, 20:5, 22:4, 5:22, 22:6, usando uma energia de colisão de 30 V e fragmentor de 60 V. MRM TAG Individual foi identificado com base no ião precursor amoniado e o ião produto da perda neutra de 22:6. TAG foi quantificado utilizando um padrão externo de tristearina a 10 µM.

Determinação do perfil de ácidos gordos e teor de óleo da semente

Nos casos em que o teor de óleo da semente tinha de ser determinado, as sementes foram secas num exsicador durante 24 h e aproximadamente 4 mg de sementes foram transferidos para um frasco de vidro de 2 ml contendo uma tampa de rosca revestida com Teflon. 0,05 mg de

triheptadecanoina dissolvidos em 0,1 ml tolueno foram adicionados ao frasco como padrão interno.

FAME da semente foram preparados adicionando 0,7 ml de HCl metanólico 1 N (SupelcoÉ ao frasco que contém o material de semente, agitando brevemente e incubando a 80 °C durante 2h. Após arrefecimento à temperatura ambiente, 0,3 ml de NaCl a 0,9 % (p/vÉ e 0,1 ml de hexano foram adicionados ao frasco e misturados bem durante 10 min num Heidolph Vibramax 110. O FAME foi recolhido num inserto de vidro de 0,3 ml e analisado por GC com um detetor de ionização de chama (FIDÉ, como mencionado anteriormente.

A área do pico de FAME individual foi primeiro corrigida com base nas respostas de área do pico da quantidade conhecida dos mesmos FAMEs presentes num padrão comercial GLC-411 (NU-CHEK PREP, INC., USAÉ. GLC-411 contém quantidades iguais de 31 ácidos gordos (% por pesoÉ, variando de C8:0 a C22:6. No caso de ácidos gordos, que não estavam presentes no padrão, os inventores levaram as respostas da área do pico do FAME mais semelhante. Por exemplo, resposta da área do pico de FAMEs de 16:1d9 foi usada para 16:1d7 e resposta FAME de C22:6 foi usada para C22:5. As áreas corrigidas foram usadas para calcular a massa de cada FAME na amostra por comparação com a massa do padrão interno. O óleo é armazenado principalmente sob a forma de TAG e o seu peso foi calculado com base no peso do FAME. As moles totais de glicerol foram determinadas calculando moles de cada FAME e dividindo as moles totais dos FAMEs por três. O TAG foi calculado como a soma de glicerol e frações de ácidos gordos usando uma relação: % de óleo por peso= 100x ((41x mol total de FAME/3É+(g total FAME- (15x mol total de FAMEÉÉÉ/g de semente, onde 41 e 45 são as massas moleculares da fração glicerol e grupo metilo, respetivamente.

Análise do teor de esterol de amostras de óleo

Amostras de aproximadamente 10 mg de óleo juntamente

com uma alíquota adicional de monol C24:0 como um padrão interno foram saponificadas usando 4 ml de KOH a 5 % em MeOH a 80 % e aquecidas durante 2 h a 80 °C, num tubo de vidro com tampa de rosca revestida com Teflon. Depois da mistura de reação ser arrefecida, 2 ml de água Milli-Q foram adicionados e os esteróis foram extraídos em 2 ml de hexano:diclorometano (4:1 v/vÉ agitando e submetendo a vórtice. A mistura foi centrifugada e o extrato de esterol foi removido e lavado com 2 ml de água Milli-Q. O extrato de esterol foi então removido após agitação e centrifugação. O extrato foi evaporado usando uma corrente de gás azoto e os esteróis sililados usando 200 ml de BSTFA e aquecimento durante 2h a 80 °C.

Para a análise de GC/GC-MS dos esteróis, derivados de esterol-OTMSi foram secos sob uma corrente de gás de azoto num bloco de calor a 40 °C e então redissolvidos em clorofórmio ou hexano imediatamente antes da análise por GC/GC-MS. Os derivados de esterol-OTMS foram analisados por cromatografia em fase gasosa (GCÉ usando um Agilent Technologies 6890A GC (Palo Alto, California, EUAÉ equipado com uma coluna capilar de sílica fundida com Supelco Equity™-1 (15 m x 0,1 mm i.d., 0,1 μm de espessura de películaÉ, um FID, um injetor *split/splitless* e um amostrador automático Agilent Technologies 7683B Series e injetor. Hélio foi o gás portador. As amostras foram injetadas no modo sem divisão num forno a temperatura de 120 °C. Após a injeção, a temperatura do forno foi elevada para 270 °C a 10 °C min^{-1} e, finalmente, a 300 °C a 5 °C min^{-1}. Os picos foram quantificados com o software Agilent Technologies ChemStation (Palo Alto, California, EUAÉ. Os resultados da GC estão sujeitos a um erro de ± 5 % das áreas dos componentes individuais.

As análises de espectrometria de massa GC (GC-MSÉ foram realizadas em um Finnigan Thermoquest GCQ GC-MS e um Finnigan Thermo Electron Corporation GC-MS; ambos os

sistemas foram equipados com um injetor na coluna e software Thermoquest Xcalibur (Austin, Texas, EUAÉ. Cada GC foi equipado com uma coluna capilar de polaridade semelhante à descrita acima. Componentes individuais foram identificados usando dados de massa espectrais e comparando os dados do tempo de retenção com aqueles obtidos e padrões de laboratório e autênticos. Uma análise em branco processual completa foi realizada simultânea ao lote de amostra.

Condições de RT-PCR

A amplificação por PCR de transcrição reversa (RT-PCRÉ foi tipicamente levada a cabo utilizando o sistema Superscript III One-Step RT-PCR (InvitrogenÉ num volume de 25 µl usando 10 pmol do iniciador direto e 30 pmol do iniciador inverso, $MgSO_4$ até uma concentração final de 2,5 mM, 400 ng de ARN total com tampão e componentes de nucleótidos de acordo com as instruções do fabricante. Esquemas de temperatura típicos foram: 1 ciclo de 45 °C durante 30 minutos para a transcrição reversa ocorrer; depois 1 ciclo de 94 °C durante 2 minutos seguido por 40 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos, 70 °C durante 1 minuto; então 1 ciclo de 72 °C durante 2 minutos antes de arrefecer as misturas de reação a 5 °C.

Produção de embriões somáticos de *B. napus* por indução com 35S-LEC2

Sementes de *B. napus* (cv. OscarÉ foram esterilizadas com gás cloro, conforme descrito por (Attila Kereszt *et al.*, 2007É. As sementes esterilizadas foram germinadas no meio MS de força 1/2 (Murashige and Skoog, 1962É com ágar a 0,8 % ajustado ao pH 5,8 e deixadas crescer a 24 °C sob iluminação fluorescente (50 $\mu E/m^2 s$É com um fotoperíodo de 18/6 h (claro/escuroÉ durante 6-7 dias. Pecíolos cotiledonares com 2-4 mm de comprimento de caule foram isolados em condições de esterilidade destas mudas e

utilizados como explantes. Culturas da estirpe AGL1 de *A. tumefaciens* transformada, uma abrigando um vetor binário específico de semente e uma segunda com uma construção de 35S-LEC2 foram inoculadas a partir de colónias individuais de placas frescas e deixadas crescer em 10 ml de meio LB com antibióticos apropriados e deixadas crescer durante a noite a 28 °C com agitação a 150 rpm. As células bacterianas foram recolhidas por centrifugação a 4000 rpm durante 5 minutos, lavadas com meio MS contendo sacarose a 2 % e ressuspensas em 10 ml do mesmo meio e deixadas crescer com antibióticos para seleção conforme apropriado durante 4 horas após a adição de acetosiringona até 100 µM. Duas horas antes de adição aos tecidos da planta, espermidina foi adicionada a uma concentração final de 1,5 mM e a densidade final das bactérias ajustadas para DO600 nm = 0,4 com meio fresco. As duas culturas bacterianas, uma carregando a construção específica de sementes e outra carregando 35S - AtLEC2, foram misturadas em razões de 1:1 a 1:1,5.

Pecíolos cotiledonares de *B. napus* recentemente isolados foram infetados com 20 ml de culturas de *A. tumefaciens* durante 6 minutos. Os pecíolos cotiledonares foram manchados em papel de filtro estéril para remover o excesso de *A. tumefaciens* e então transferidos para meios de cocultivo (meio MS com TDZ a 1 mg/l, NAA a 0,1 mg/l, acetosiringona a 100 µM suplementado com L-cisteína (50 mg/l), ácido ascórbico (15 mg/l) e MES (250 mg/l)). As placas foram seladas com fita micropore e incubadas no escuro a 24 °C durante 48 horas. Os explantes cocultivados foram transferidos para o meio de pré-seleção (MS contendo TDZ a 1 mg/l, NAA a 0,1 mg/l, $AgNO_3$ a 3 mg/l, cefotaxima a 250 mg/l e timentina a 50 mg/l) e cultivados durante 4-5 dias a 24 °C com um fotoperíodo de 16 h/8 h. Os explantes foram transferidos para meios de seleção (MS contendo TDZ a 1 mg/l, NAA a 0,1 mg/l, $AgNO_3$ a 3 mg/l, cefotaxima a 250

mg/l e timentina a 50 mg/lÉ de acordo com o gene marcador selecionável no vetor específico de semente e cultivados durante 2-3 semanas a 24 °C com um fotoperíodo de 16 h/8 h. Explantes com calo embriogénico verde foram transferidos para o meio MS isento de hormonas (MS com $AgNO_3$ a 3 mg/l, cefotaxima a 250 mg/l, timentina a 50 mg/l e o agente de seleçãoÉ e cultivadas durante 2-3 semanas adicionais. Embriões de estágio torpedo ou cotiledonar isolados de explantes sobreviventes no meio de seleção foram analisados quanto à composição de ácidos gordos nos seus lípidos totais usando GC.

ExemploÓ2.ÓExpressãoÓestávelÓdeÓviasÓdeÓDHAÓtransgénicasÓemÓsementesÓdeÓ*Arabidopsis thaliana*

Construção de vetor binário

Os vetores binários pJP3416-GA7 e pJP3404 continham 7 genes da biossíntese de ácidos gordos heterólogos, que codificam 5 dessaturases e 2 elongases e um marcador selecionável de planta entre as repetições de fronteira esquerda e direita do T-ADN presente em cada vetor (Figuras 2 e 3É. A SEQ ID NO: 1 fornece a sequência de nucleótidos na região de T-ADN da pJP3416-GA7 das sequências da fronteira direita para a esquerda. As duas construções genéticas continham genes otimizados quanto aos codões da planta que codificam uma Δ12-dessaturase de *Lachancea kluyveri* (compreendendo os nucleótidos 14143-16648 da SEQ ID NO: 1É, uma ω3-dessaturase de *Pichia pastoris* (compreendendo os nucleótidos 7654-10156 da SEQ ID NO: 1É, uma Δ6-dessaturase de *Micromonas pusilla* (compreendendo os nucleótidos 226-2309 da SEQ ID NO: 1É, Δ5 e Δ4-dessaturases de *Pavlova salina* (compreendendo os nucleótidos 4524-6485 e 10157-14142 da SEQ ID NO: 1, respetivamenteÉ e Δ6 e Δ5-elongases de *Pyramimonas cordata* (compreendendo os nucleótidos 2310-4523 e 17825-19967 da SEQ ID NO: 1, respetivamenteÉ. As regiões específicas da região T-ADN (orientação: sequências da fronteira direita para esquerdaÉ

do vetor binário pJP3416-GA7 em relação à SEQ ID NO: 1 são as seguintes:

Nucleótidos 1-163: Fronteira direita; 480-226, terminador de nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens* (TER_NOSÉ; 1883-489, Δ6-dessaturase de *Micromonas pusilla*; 2309-1952, promotor de napina truncado de *Brassica napus* (PRO_FP1É; 2310-3243, promotor de FAE1 de *Arabidopsis thaliana* (PRO_FAE1É; 3312-4181, Δ6-elongase de *Pyramimonas cordata*; 4190-4523, terminador de lectina de *Glycine max* (TER_LectinÉ; 4524-4881, PRO_FP1; 4950-6230: Δ5-dessaturase de *Pavlova salina*; 6231-6485: TER_NOS; 7653-6486, região de anexo da matriz Rb7 de *Nicotiana tabacum* (MARÉ; 8387-7654, terminador de conlinina1 de *Linum usitatissimum* (TER_Cn11É; 9638-8388, ω3-dessaturase de *Pichia pastoris*; 10156-9707, promotor de conlinina1 de *Linum usitatissimum* (PRO_Cn11É; 10157-12189, promotor de conlinina1 de *Linum usitatissimum*; 12258-13604, Δ4-dessaturase de *Pavlova salina*; 13605-14142, terminador de conlinina2 de *Linum usitatissimum*; 14143-14592, PRO_Cn11; 14661-15914, Δ12-dessaturase de *Lachancea kluyveri*; 15915-16648, TER_Cn11; 17816-16649, MAR; 17825-18758, PRO_FAE1; 18827-19633, Δ5-elongase de *Pyramimonas cordata*; 19634-19967, TER_Lectina; 19990-20527, promotor 35S do vírus mosaico da couve-flor com região potencializadora duplicada; 20537-21088, genes fosfinotricina-N-acetiltransferase *de Streptomyces viridochromo*; 21097-21349, TER_NOS; 21367-21527, fronteira esquerda.

As sete regiões de codificação nas construções estão cada uma sob o controlo de um promotor específico de semente - três promotores diferentes foram utilizados, nomeadamente, o promotor truncado de napina de *Brassica napus* (pBnFP1É, o promotor de FAE1 de *Arabidopsis thaliana* (pAtFAE1É e o promotor de conlinina 1 de *Linum usitatissimum* (pLuCn11É. Os sete genes da biossíntese de

ácidos gordos juntos codificam uma via de síntese de DHA inteira que foi projetada para converter $18:1^{\Delta 9}$ (ácido oleicoÉ através de $22:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ (DHAÉ. Ambos os vetores binários continham uma região de codificação de marcador selecionável da planta BAR operativamente ligada a um promotor 35S do Vírus Mosaico de Couve-flor (CaMVÉ com região potencializadora de duplicação e terminador de transcrição da região de poliadenilação 3' de *A. tumefaciens*. O marcador selecionável de planta estava situado adjacente à fronteira esquerda da região de T-ADN, portanto, localizada distalmente no T-ADN em relação à orientação da transferência de T-ADN dentro das células da planta. Isto aumentou a probabilidade de que a transferência parcial do T-ADN, que seria provável de não incluir o gene marcador selecionável, não fosse selecionada. pJP3416-GA7 e pJP3404 continham, cada um, uma origem de replicação de RiA4 de *Agrobacterium rhizogenes* (Hamilton, 1997É.

pJP3416 GA7 foi gerado pela síntese da região de ADN correspondente aos nucleótidos 226-19975 da SEQ ID NO: 1 (região GA7É e inserindo esta região no vetor binário recetor pJP3416 no sítio *Psp*OMI. Cada gene da biossíntese de ácido gordo no GA7 inclui uma região não traduzida 5' (5'UTRÉ do Vírus Mosaico do Tabaco que estava operativamente ligada a cada região de codificação, entre o promotor e a iniciação da tradução ATG, para maximizar a eficiência da tradução dos ARNm produzidos a partir dos genes. A construção GA7 também incluiu duas sequências de regiões de ligação de matriz de *Nicotiana tabacum* Rb7 (MARÉ, conforme descrito por Hall *et al*. (1991É. Sequências MAR, às vezes denominadas regiões de ligação nuclear, são conhecidas por ligar-se especificamente à matriz nuclear *in vitro* e podem mediar a ligação da cromatina à matriz nuclear *in vivo*. Imagina-se que MARs funcionem para reduzir o transgene de silenciamento. Em pJP3416-GA7 os MARs também

foram inseridos e posicionados dentro da região T-ADN a fim de atuar como espaçadores de ADN para isolar as cassetes de expressão transgénica. O vetor pJP3416 antes da inserção da região GA7 continha apenas a cassete de marcador selecionável de planta entre as fronteiras.

A construção genética pJP3404 foi preparada por inserções baseadas em enzima de restrição sequenciais, na qual cassetes de gene foram adicionadas ao vetor binário, pJP3367, que compreendia os genes para a produção de SDA nas sementes. Esta construção continha genes que codificam Δ12-dessaturase de *L. kluyveri* e ω3-dessaturase de *P. pastoris*, ambas expressas pelo promotor truncado de napina (FP1É de *B. napus*, e Δ6-dessaturase de *M. pusilla* expressa pelo promotor de FAE1 de *A. thaliana* (Figura 4É. Em primeiro lugar, o intrão FAD2 de *A. thaliana* foi flanqueado por sítios *Eco*RI e clonado para o sítio *Mfe*I de pJP3367 para gerar pJP3395. Um fragmento contendo as cassetes Δ6 e Δ5-elongase de *P. cordata* dirigidas pelos promotores FAE1 e FP1, respetivamente, foi clonado no sítio *Kas*I de pJP3395 para gerar pJP3398. pJP3399 então foi gerado, substituindo a origem de replicação RK2 em pJP3398 por uma origem de replicação RiA4. O vetor binário final, pJP3404, foi gerado pela clonagem de um fragmento flanqueado por *Sbf*I contendo as cassetes de Δ5 - e Δ4-dessaturase de *P. salina* dirigidas pelos promotores FP1 e FAE1, respetivamente, para o sítio *Sbf*I de pJP3399.

Transformação de *A. thaliana* e análise da composição de ácidos gordos

Os vetores quiméricos foram introduzidos na estirpe AGL1 de *A. tumefaciens* e células provenientes de culturas do *Agrobacterium* transformado foram usadas para tratar as plantas *A. thaliana* (ecotipos Columbia e um mutante fad2É usando o método de imersão floral para transformação (Clough and Bent, 1998É. Após a maturação, as sementes de T_1 de plantas tratadas foram colhidas e colocadas em placas

MS contendo PPT para a seleção de plantas que contêm o gene marcador selecionável de BAR. Mudas T_1 sobreviventes e saudáveis foram transferidas para o solo. Após o crescimento das plantas até à maturidade e permitindo a autofertilização, as sementes de T_2 destas plantas foram colhidas e a composição de ácidos gordos dos lípidos das sementes foi analisada através da análise de GC, conforme descrito no exemplo 1.

Os dados para o nível de DHA nos lípidos das sementes são mostrados na Figura 5 (pistas marcadas com T_2É para 13 transformantes usando pJP3416-GA7 para o fundo genético de Columbia, e para seis transformantes usando o mutante *fad2*. A construção de pJP3416-GA7 resultou na produção de níveis ligeiramente mais elevados de DHA, como uma percentagem do teor total de ácidos gordos em média, em comparação com a construção pJP3404. O Quadro 4 mostra a composição de ácidos gordos dos lípidos totais da semente das linhagens T_2 com os níveis de DHA mais altos. As eficiências de conversão calculadas para cada etapa enzimática na produção de DHA a partir do ácido oleico nas mesmas sementes são mostradas no Quadro 5. As eficiências de conversão foram calculadas como (% de produtos x 100É/(% de substrato restante + % de produtosÉ, assim expressas como percentagem.

O nível de DHA mais alto observado produzido nas linhagens T_2 pJP3416-GA7 transformadas foi de 6,2 %, adicionalmente com 0,5 % EPA e 0,2 % DPA (linhagem Ã14É. Estas sementes T_2 foram ainda segregavam para o transgene, ou seja, não eram ainda uniformemente homozigotas. Dados compilados do perfil lipídico total de semente das sementes transgénicas independentes (Quadro 4É são mostrados no Quadro 6. O nível de ácidos gordos ω3 produzido como resultado dos transgenes nestas sementes (ácidos gordos ω3 novos totais, excluindo o nível de ALA que foi produzido endogenamente no fundo de ColumbiaÉ foi 10,7 %, enquanto o

nível de ácidos gordos ω6 (ácidos gordos ω6 novos totais mas excluindo $18:2^{\Delta 9,12}$É foi 1,5 %. Isto representa uma razão extremamente favorável de novos ácidos gordos ω3: novos ácidos gordos ω6, nomeadamente 7,3:1.

As sementes T_2 das linhagens selecionadas transformadas com pJP3416-GA7, nomeadamente para linhagens designadas 7, 10, 14, 22 e 34 no fundo Columbia e para linhagens designadas 18, 21 e 25 no fundo do mutante *fad2*, foram colocadas em placas em meio MS contendo PPT para seleção de mudas transgénicas *in vitro*. Vinte mudas resistentes ao PPT para cada linhagem foram transferidas para o solo e deixadas crescer até a maturidade após a fertilização. Estas plantas foram altamente suscetíveis de ser homozigotas para o gene marcador selecionável e, portanto, para pelo menos uma inserção de T-ADN no genoma das plantas. As sementes T_3 destas plantas foram colhidas e analisadas para composição de ácidos gordos no seu óleo de semente por GC. Os dados são mostrados no Quadro 7. Esta análise revelou que a construção pJP3416-GA7 gerou níveis mais elevados de DHA LC-PUFA ω3 nas sementes T_3 das plantas homozigotas do que na semente T_2 segregante. Até cerca de 13,9 % DHA foi observado na linhagem transformada T_3 pJP3416-GA7 designada 22,2 no fundo de Columbia, aumentado de cerca de 5,5 % na semente T_2 hemizigota, com um nível de soma de cerca de 24,3 % de ácidos gordos ω3 novos como uma percentagem dos ácidos gordos totais do teor de lípidos das sementes. Novos ácidos gordos ω6 estavam num nível de 1,1 % do total de ácidos gordos, o que representa uma razão muito favorável de novos ácidos gordos ω3:novos ácidos gordos ω6, ou seja, cerca de 22:1. Da mesma forma, transformantes no fundo mutante de *fad2* geraram 20,6 % como uma soma de ácidos gordos ω3 novos, incluindo 11,5 % de DHA, como uma percentagem dos ácidos gordos totais do teor de lípidos de semente.

QuadroÓ 4. Composição de ácidos gordos do lípido total de

semente a partir de sementes de *Arabidopsis* T_2 transgénicas independentes com níveis DHA na extremidade superior do intervalo observado. "Col" refere-se ao ecotipo Columbia e "FAD2" ao ecotipo do mutante *fad2*. "GA7" refere-se à transformação com o T-ADN do vetor pJP3416-GA7, pJP3404 com o T-ADN do vetor pJP3404. Os ácidos gordos 20:1n-9 e 20:1n-11 não foram revelados na análise GC. Os "outros ácidos gordos secundários" incluem 14:0, 16:1n7, 16:1n9, 16:1n13t, 16:2n6, 16:3n3, i18:0, 18:1n5, 20:1n5, 22:0, 22:1n7, 22:1n11/n13, 24:0, 24:1n9.

	pJP3404_Col_ó1	pJP3404óFAD2ó631	GA7_Col_ó7	GA7_Col_ó34	GA7_Col_ó2	GA7_Col_ó10	GA7_Col_ó22	GA7_Col_ó14	GA7_FAD2ó625	GA7_FAD2ó621	GA7_FAD2ó618
16:0	9,6	7,8	8,7	8,2	8,7	8,6	8,3	9,7	7,2	8,5	7,5
18:0	2,9	3,9	3,7	3,9	3,6	3,3	3,4	3,6	3,2	3,9	3,0
18:1d11	2,2	1,8	2,0	1,9	2,0	2,3	2,3	2,7	1,9	2,0	1,8
20:0	1,6	2,3	2,0	2,0	2,1	1,6	1,6	1,8	1,6	2,2	1,5
20:1d13	2,2	1,8	1,6	1,5	1,7	1,6	1,5	1,7	1,5	1,7	1,4
20: 1d9/d11	13,0	15,9	16,1	16,1	16,3	15,0	13,9	13,5	18,3	15,9	17,0
22:1d13	1,1	1,2	1,1	1,1	1,3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,3	1,2
Outros secundários	1,9	1,5	1,5	1,4	1,5	1,3	1,6	1,7	1,6	1,4	1,6
18:1d9	10,8	14,0	10,6	10,6	10,1	11,1	10,0	7,7	26,0	8,2	20,9

18:2ω6	28,9	28,3	16,4	16,1	18,2	13,7	13,7	11,4	6,6	16,6	4,3
18:3ω3	16,6	14,9	29,6	29,6	27,5	32,4	30,4	32,8	21,9	27,7	30,1
18:3ω6	0,7	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1
20:2ω6	1,6	1,5	1,1	1,2	1,3	1,0	1,0	1,0	0,4	1,4	0,4
20:3ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:4ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:4ω6	1,6	0,6	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,4
22:5ω6	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:4ω3	1,0	0,5	1,2	1,1	1,1	1,5	2,7	2,7	1,9	1,8	1,7
20:3ω3	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,6	0,7	0,0	0,8	0,6
20:4ω3	0,4	0,6	0,6	0,7	0,5	0,8	0,8	0,4	1,0	0,8	0,8
20:5ω3ố	**0,2ố**	**0,2ố**	**0,3ố**	**0,3ố**	**0,3ố**	**0,3ố**	**0,7ố**	**0,5ố**	**0,6ố**	**0,4ố**	**0,5ố**
22:5ω3ố	**0,0ố**	**0,2ố**	**0,2ố**	**0,2ố**	**0,2ố**	**0,2ố**	**0,2ố**	**0,2ố**	**0,3ố**	**0,3ố**	**0,3ố**
22:6ω3ố	**3,6ố**	**2,4ố**	**3,0ố**	**3,1ố**	**3,3ố**	**3,9ố**	**5,5ố**	**6,2ố**	**4,3ố**	**4,4ố**	**4,8ố**

Quadroố5. Eficiências de conversão das etapas enzimáticas individuais para a produção de DHA a partir do ácido oleico, observadas em lípidos de semente totais a partir das sementes transgénicas independentes como para o Quadro 4.

		pJP3404_Col_δ1	pJP3404_FAD2_δ31	GA7_Col_δ7	GA7_Col_δ34	GA7_Col_δ2	GA7_Col_δ10	GA7_Col_δ22	GA7_Col_δ14	GA7_FAD2_δ25	GA7_FAD2_δ21	GA7_FAD2_δ18
	d12-des	69,6 %	62,5 %	66,4 %	66,6 %	66,7 %	67,5 %	70,2 %	72,7 %	45,9 %	69,5 %	53,7 %
	d15-des	39,8 %	37,8 %	66,1 %	66,8 %	62,3 %	72,1 %	72,7 %	77,2 %	79,7 %	66,0 %	88,1 %
Ómega-6	d6-des	4,5 %	2,5 %	0,7 %	0,7 %	0,7 %	0,9 %	1,3 %	1,0 %	1,6 %	1,1 %	1,1 %
	(d9-elo)	3,1 %	3,1 %	2,2 %	2,3 %	2,4 %	1,8 %	1,8 %	1,7 %	1,2 %	2,7 %	0,9 %
	d6-elo	71,4 %	56,9 %	83,3 %	83,4 %	83,0 %	84,7 %	70,3 %	74,5 %	85,5 %	66,1 %	88,0 %
	d5-des	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	d5-elo	100,0%	97,8 %	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	d4-des	6,2 %	13,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Ómega-3	d6-des	23,9 %	21,0 %	15,2 %	15,4 %	16,4 %	17,1 %	24,7 %	23,6 %	27,1 %	21,9 %	21,0 %
	(d9-elo)	0,0 %	0,0 %	0,0 %	1,8 %	0,0 %	0,0 %	2,0 %	2,2 %	0,0 %	2,6 %	2,1 %
	d6-elo	80,6 %	86,6 %	77,7 %	79,6 %	79,4 %	77,5 %	72,7 %	73,0 %	76,7 %	77,4 %	79,2 %
	d5-des	93,7 %	92,1 %	91,7 %	91,4 %	91,5 %	92,6 %	89,6 %	92,4 %	88,0 %	91,8 %	91,0 %
	d5-elo	93,7 %	92,1 %	91,7 %	91,4 %	91,5 %	92,6 %	89,6 %	92,4 %	88,0 %	91,8 %	91,0 %

	d4-des	100,0 %	90,6 %	94,8 %	94,0 %	95,3 %	94,4 %	95,8 %	96,9 %	93,1 %	92,9 %	94,2 %

QuadroÓ 6. Dados compilados a partir dos perfis de lípido total de semente a partir das sementes transgénicas independentes mostradas no Quadro 2. Os cálculos não incluem os "ácidos gordos secundários" no Quadro 4.

Parâmetro	pJP3404_Col_ó1	pJP3404_FAD2_ó31	GA7_Col_ó7	GA7_Col_ó34	GA7_Col_ó2	GA7_Col_ó10	GA7_Col_ó22	GA7_Col_ó14	GA7_FAD2_ó25	GA7_FAD2_ó21	GA7_FAD2_ó18
w3ÓtotalÓ(%ÓdeÓFA total)	21,8	18,8	34,9	35,6	32,9	39,1	40,9	43,5	30,0	36,2	38,8
w6ÓtotalÓ(%ÓdeÓFA total)	32,9	31,0	17,9	17,7	19,9	15,2	15,4	12,9	7,6	18,6	5,2
RazãoÓdeÓw3/w6	0,66	0,61	1,95	2,01	1,65	2,57	2,66	3,37	3,95	1,95	7,46
RazãoÓdeÓw6/w3	1,51	1,65	0,51	0,50	0,60	0,39	0,38	0,30	0,25	0,51	0,13
w3ÓnovoÓtotalÓ(%Óde FAÓtotal)	5,2	3,9	5,3	6,0	5,4	6,7	10,5	10,7	8,1	8,5	8,7
w6ÓnovoÓtotalÓ(%Óde FAÓtotal)	4,0	2,7	1,5	1,6	1,7	1,5	1,7	1,5	1,0	2,0	0,9
RazãoÓdeÓw3/w6Ónovos	1,30	1,44	3,53	3,75	3,18	4,47	6,18	7,13	8,10	4,25	9,67
RazãoÓdeÓw6/w3Ónovos	0,77	0,69	0,28	0,27	0,31	0,22	0,16	0,14	0,12	0,24	0,10
EficiênciaÓdeÓOA paraÓEPA	4,8 %	3,5 %	4,3 %	4,4 %	4,7 %	5,4 %	7,9 %	8,8 %	6,3 %	6,4 %	6,7 %
EficiênciaÓdeÓOA paraÓDHA	4,5 %	3,0 %	3,7 %	3,8 %	4,1 %	4,8 %	6,8 %	7,9 %	5,2 %	5,5 %	5,8 %

EficiênciaÓdeÓLA paraÓEPA	6,9 %	5,6 %	6,6 %	6,8 %	7,2 %	8,1 %	11,4 %	12,2 %	13,8 %	9,3 %	12,7 %
EficiênciaÓdeÓLA paraÓDHA	6,6 %	4,8 %	5,7 %	5,8 %	6,3 %	7,2 %	9,8 %	11,0 %	11,4 %	8,0 %	10,9 %
EficiênciaÓdeÓALA paraÓEPA	17,4 %	14,9 %	10,0 %	10,1 %	11,6 %	11,3 %	15,6 %	15,9 %	17,3 %	14,1 %	14,4 %
EficiênciaÓdeÓALA paraÓDHA	16,5 %	12,8 %	8,6 %	8,7 %	10,0 %	10,0 %	13,4 %	14,3 %	14,3 %	12,2 %	12,4 %
SaturadosÓtotais	14,1	14,0	14,4	14,1	14,4	13,5	13,3	15,1	12,0	14,6	12,0
Monoinsaturados totais	29,3	34,7	31,4	31,2	31,4	31,0	28,7	26,6	48,7	29,1	42,3
Polinsaturados totais	54,7	49,8	52,8	53,3	52,8	54,3	56,3	56,4	37,6	54,8	44,0
C20Ótotal	17,4	20	19,7	20,4	20,1	18,7	18,5	17,8	21,8	21	20,7
C22Ótotal	6,4	4,5	4,6	4,7	5,1	5,5	7,2	7,8	6,1	6,4	6,7
RazãoÓdeÓC20/C22	2,72	4,44	4,28	4,34	3,94	3,40	2,57	2,28	3,57	3,28	3,09

QuadroÓ7. Composição de ácidos gordos de lípido de semente total a partir das sementes descendentes de *Arabidopsis* T_3 e T_4 transgénicas independentes obtidas a partir de linhagens de planta como no Quadro 3. O erro mostrado na geração T_4 denota o DP de n=10.

	GA7_Col_7.2	GA7_Col_34.2	GA7_Col_10.13	GA7_Col_22.2	GA7_Col_14.19	GA7FAD2-	GA7FAD2-21.2	GA7FAD2-	T_4ÓCol_22.2Ó (médiaÓ±ÓDP)	T4ÓCol_22.2 melhorÓlinhagem
16:0	9,8	9,0	9,5	11,2	10,4	8,1	10,7	7,7	10,6±0,9	12,2

18:0	4,0	3,8	4,2	3,4	3,5	3,5	3,8	3,3	3,5±0,4	3,6
18:1n7	2,0	1,9	2,2	2,9	2,5	1,7	2,2	1,6	2,3±0,2	2,6
20:0	2,2	1,9	1,7	1,4	2,3	1,8	2,0	1,9	1,9±0,3	2,0
20:1d13	1,4	1,3	1,2	1,6	2,5	1,2	1,4	1,3	1,6±0,2	1,9
20:1d9/11	13,6	14,7	12,4	9,5	13,0	15,7	12,4	18,4	11,7±1,7	9,5
22:1d13	1,2	1,2	0,8	0,6	1,6	1,0	1,1	1,5	0,9±0,1	0,8
Outros secundários	1,8	1,5	1,5	2,1	2,6	1,7	1,9	1,6	1,9±0,1	2,3
18:1d9	5,5	6,7	6,8	4,6	6,9	11,3	4,2	11,5	4,6±1,0	3,3
18:2ω6	7,5	7,9	7,4	5,6	14,8	5,8	8,9	5,6	5,3±0,9	4,3
18:3ω3	33,7	33,7	36,1	31,5	26,1	28,3	28,9	30,8	31,0+1,1	29,5
18:3ω6	0,2	0,2	0,2	0,4	0,1	0,3	0,6	0,1	0,4±0,1	0,4
20:2ω6	1,0	1,0	0,7	0,7	1,4	0,6	1,2	0,6	0,9±0,1	0,9
20:3ω6	0	0	0	0	0	0	0	0		
20:4ω6	0	0	0	0	0	0	0	0		
22:4ω6	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1±0,0	0,1
22:5ω6	0	0	0	0	0	0	0	0		
18:4ω3	3,1	2,6	3,0	5,3	3,3	3,7	5,2	2,6	4,8±0,9	5,5
20:3ω3	1,4	1,3	1,2	1,3	1,2	1,1	1,3	1,3	1,5±0,2	1,7

20:4ω3	0,7	0,6	0,6	0,9	0,2	1,7	0,9	0,9	0,8±0,2	0,8
20:5ω3	0,9	0,9	0,7	1,9	0,8	1,2	1,0	0,8	1,5±0,3	1,8
22:5ω3	0,7	0,6	0,6	1,0	0,4	0,8	0,6	0,5	1,1±0,2	1,5
22:6ω3	9,5	9,2	9,4	13,9	6,6	10,3	11,5	7,9	13,3±1,6	15,1

As eficiências de conversão enzimática para cada etapa da enzima na via para a produção de DHA a partir do ácido oleico são mostradas no Quadro 8 para as sementes de T_3 com os níveis mais elevados de DHA. A eficiência de conversão de Δ12-dessaturase em sementes da linhagem 22,2 foi de 81,6 % e a eficiência da ω3-dessaturase foi de 89,1 %, ambas incrivelmente altas e indicando que estas enzimas fúngicas (levedura) foram capazes de funcionar bem em sementes em desenvolvimento. As atividades das outras enzimas exógenas na via de DHA foram elevadas de forma semelhante para substratos de ω3 com a Δ6-dessaturase agindo a uma eficiência de 42,2 , Δ6-elongase a uma eficiência de 76,8 %, Δ5-dessaturase a 95,0 %, Δ5-elongase a 88,7 % e Δ4-dessaturase a 93,3 %. A atividade de Δ6-dessaturase no substrato de ω6 LA foi muito menor, com a Δ6-dessaturase agindo a uma eficiência de conversão de apenas 0,7 % sobre LA. GLA esteve presente a um nível de 0,4 % e foi o único produto de ω6 novo além de 20:2ω6 detetado nas sementes T_3 com o mais alto teor de DHA. Dados compilados a partir dos perfis de lípido total de semente a partir das sementes transgénicas independentes (Quadro 7) são mostrados no Quadro 9. Estes dados para a linhagem com o maior nível de DHA incluíram uma razão de ω6 FA total (incluindo LA) para ω3 FA total (incluindo ALA) de 0,10. A razão de ω6 FA novo (excluindo LA) para ω3 FA novo (excluindo ALA) nos lípidos desta linhagem foi de 0,05. Os níveis de ácidos gordos polinsaturados totais foram de mais de 50 % nestas linhagens e de mais do que 60 % em pelo

menos 4 das linhagens. As eficiências de conversão gerais foram calculadas como sendo: OA para EPA = 21,8 %, OA para DHA = 18,0 %, LA para EPA = 26,9 %, LA para DHA = 22,2 %, ALA para EPA = 30,1 %, ALA para DHA = 24,9 %.

Quadro 8. Eficiências de conversão das etapas enzimáticas individuais para a produção de DHA a partir de ácido oleico, observadas em lípidos de semente totais a partir das sementes de *Arabidopsis* T_3 transgénicas como no Quadro 7.

		GA7_Col_7.2	GA7_Col_34.2	GA7_Col_10.13	GA7_Col_22.2	GA7_Col_14.19	GA7_FAD2-25.10	GA7_FAD2-21.2	GA7_FAD2-18.14	T_4 Col_22.2 (média)	T_4 Col_22.2 melhor linhagem
	d12-des	75,4 %	73,1 %	75,7 %	81,6 %	73,4 %	66,6 %	78,5 %	63,1 %	67,6 %	82,7 %
	d15-des	85,3 %	84,4 %	86,2 %	89,1 %	70,2 %	87,5 %	82,2 %	87,6 %	81,0 %	90,9 %
Ómega-6	d6-des	0,3 %	0,3 %	0,3 %	0,7 %	0,3 %	0,6 %	1,0 %	0,2 %	1,3 %	0,7 %
	(d9-elo)	1,7 %	1,7 %	1,2 %	1,2 %	2,6 %	1,1 %	2,0 %	1,3 %	1,6 %	1,5 %
	d6-elo										
	d5-des										
	d5-elo										
	d4-des										
Ómega-3	d6-des	30,7 %	29,3 %	28,2 %	42,2 %	30,2 %	38,5 %	40,0 %	29,2 %	41,0 %	45,7 %
	(d9-elo)	2,7 %	2,7 %	2,3 %	2,4 %	3,0 %	2,3 %	2,7 %	2,9 %	2,8 %	3,1 %
	d6-elo	79,0 %	81,1 %	79,0 %	76,8 %	70,9 %	79,2 %	73,2 %	79,1 %	77,5 %	77,7 %

	d5-des	94,0 %	94,6 %	94,5 %	95,0 %	97,9 %	87,8 %	93,3 %	91,1 %	95,0 %	95,8 %
	d5-elo	91,9 %	91,7 %	93,6 %	88,7 %	89,5 %	89,9 %	92,2 %	91,6 %	90,8 %	90,2 %
	d4-des	93,2 %	93,7 %	94,4 %	93,3 %	93,7 %	92,5 %	95,0 %	93,9 %	92,2 %	90,9 %

QuadroÓ 9. Dados compilados a partir dos perfis de lípido total de semente a partir das sementes transgénicas independentes mostradas no Quadro 5. Os cálculos não incluem os "ácidos gordos secundários" no Quadro 7.

Parâmetro	GA7-Col_7.2	GA7-Col_34.2	GA7-Col_10.13	GA7-Col_22.2	GA7-Col_14.19	GA7-FAD2-25.10	GA7-FAD2-21.2	GA7-FAD2-18.14	T4ÓCol_22.2Ó (médiaÆDP)	T4ÓCol_22.2ÓmelhorÓ linha
w3ÓtotaléÓ(%ÓdeÓFAÓtotal)	50,0	48,9	51,6	55,8	38,6	47,1	49,4	44,8	54,0	55,9
w6ÓtotaléÓ(%ÓdeÓFAÓtotal)	8,7	9,1	8,3	6,7	16,3	6,7	10,7	6,3	6,7	5,7
RazãoÓdeÓw3/w6	5,75	5,37	6,22	8,33	2,37	7,03	4,62	7,11	8,06	9,81
RazãoÓdeÓw6/w3	0,17	0,19	0,16	0,12	0,42	0,14	0,22	0,14	0,12	0,10
w3ÓnovoÓtotaléÓ(%ÓdeÓFA total)	16,3	15,2	15,5	24,3	12,5	18,8	20,5	14,0	23,0	26,4
w6ÓnovoÓtotaléÓ(%ÓdeÓFA total)	1,2	1,2	0,9	1,1	1,5	0,9	1,8	0,7	1,4	1,4
RazãoÓdeÓw3/w6Ónovos	13,58	12,67	17,22	22,09	8,33	20,89	11,39	20,00	16,43	18,86
RazãoÓdeÓw6/w3Ónovos	0,07	0,08	0,06	0,05	0,12	0,05	0,09	0,05	0,06	0,05
EficiênciaÓdeÓOAÓparaÓEPA	14,1 %	13,3 %	13,4 %	21,8 %	10,2 %	15,0 %	16,8 %	11,2 %	20,4 %	24,5 %
EficiênciaÓdeÓOAÓparaÓDHA	12,0 %	11,4 %	11,8 %	18,0 %	8,6 %	12,6 %	14,8 %	9,6 %	17,1 %	20,1 %
EficiênciaÓdeÓLAÓparaÓEPA	18,9 %	18,4 %	17,9 %	26,9 %	14,2 %	22,9 %	21,8 %	18,0 %	26,2 %	29,9 %
EficiênciaÓdeÓLAÓparaÓDHA	16,2 %	15,9 %	15,7 %	22,2 %	12,0 %	19,1 %	19,1 %	15,5 %	21,9 %	24,5 %
EficiênciaÓdeÓALAÓparaÓEPA	22,2 %	21,9 %	20,7 %	30,1 %	20,2 %	26,1 %	26,5 %	20,5 %	29,4 %	32,9 %

EficiênciaÓdeÓALAÓparaÓDHA	19,0 %	18,8 %	18,2 %	24,9 %	17,1 %	21,9 %	23,3 %	17,6 %	24,6 %	27,0 %
SaturadosÓtotais	16,0	14,7	15,4	16,0	16,2	13,4	16,5	12,9	16,0	17,8
MonoinsaturadosÓtotais	23,7	25,8	23,4	19,2	26,5	30,9	21,3	34,3	21,1	18,1
PolinsaturadosÓtotais	58,7	58,0	59,9	62,5	54,9	53,8	60,1	51,1	60,7	61,6
C20Ótotal	19	19,8	16,8	15,9	19,1	21,5	18,2	23,3	18	16,6
C22Ótotal	11,4	11	10,8	15,5	8,6	12,1	13,2	9,9	15,4	17,5
RazãoÓdeÓC20/C22	1,67	1,80	1,56	1,03	2,22	1,78	1,38	2,35	1,17	0,95

As sementes T_3 da linhagem de pJP3416-GA7 22.2 no fundo de Columbia, que eram descendentes da linhagem T_2 22, foram semeadas diretamente ao solo e a composição de ácidos gordos das sementes maduras das plantas T_3 resultantes foi analisada por GC. O nível de DHA médio dessas sementes foi 13,3 % ± 1,6 (n=10É como uma percentagem dos ácidos gordos totais no lípido da semente. Conforme mostrado no Quadro 6 (coluna do lado direitoÉ, a linhagem com o nível mais elevado de DHA continha 15,1 % de DHA nos ácidos gordos totais dos lípidos da semente. As eficiências de conversão enzimática são mostradas no Quadro 8 para cada etapa na produção de DHA a partir do ácido oleico.

A razão de ω6 FA total (incluindo LAÉ para ω3 FA (incluindo ALAÉ na linhagem com o nível mais elevado de DHA foi de 0,102. A razão de ω6 FA novo (excluindo LAÉ para ω3 FA novo (excluindo ALAÉ na linhagem com o nível mais elevado de DHA foi de 0,053. O nível de ácidos gordos saturados totais foi cerca de 17,8 % e o nível de ácidos gordos monoinsaturados foi cerca de 18,1 %. O nível de ácidos gordos ω6 totais foi cerca de 5,7 % e o nível de ácidos gordos ω3 foi cerca de 55,9 %. As eficiências de conversão gerais foram calculadas para ser: OA para EPA = 24,5 %, OA para DHA = 20,1 %, LA para EPA = 29,9 %, LA para DHA = 24,5 %, ALA para EPA = 32,9 %, ALA para DHA = 27,0 %.

Verificou-se que os ácidos gordos ómega-3 totais se acumularam até 55,9 % dos ácidos gordos totais, enquanto os ácidos gordos ómega-6 consistiram em 5,7 % do perfil total.

Realizou-se uma análise de hibridação por *Southern blot*. Os resultados mostraram que as linhagens de alta acumulação de DHA tinham uma cópia simples ou dupla do T-ADN da construção pJP3416-GA7 com exceção da linhagem transgénica ColumbiaÃ22, que tinha três inserções de T-ADN no genoma da planta *Arabidopsis*. A semente da geração T_5 também foi analisada e verificou-se ter até 13,6 % de DHA nos lípidos totais da semente. Verificou-se que a construção GA7 era estável ao longo de várias gerações em termos de capacidade de produção de DHA.

Determinação do teor de óleo nas linhagens DHA de *A. thaliana* transgénica

O teor de óleo das sementes transgénicas de *A. thaliana* com vários níveis de DHA foi determinado por GC, conforme descrito no Exemplo 1. Os dados são mostrados na Figura 6, representando graficamente o teor de óleo (% de óleo por peso de sementesÉ frente ao teor de DHA (como uma percentagem dos ácidos gordos totaisÉ. Foram observados até 26,5 mg de DHA por grama de sementes (Quadro 10É. Verificou-se que o teor de óleo das sementes transgénicas de *Arabidopsis* estava negativamente correlacionado com o teor de DHA. A quantidade de DHA por peso de sementes foi maior nas sementes transformadas com um nível de DHA de cerca de 9 % em relação às sementes com cerca de 14 % de DHA. Não foi determinado se isto seria verdade para as sementes diferentes de *Arabidopsis*.

QuadroÓ10. Proporção e quantidade de DHA em sementes de *Arabidopsis* transformadas por GA7.

	Teor de DHA (% de TFAÉ	Teor de óleo (% de óleo por g de sementesÉ	Teor de DHA por peso (mg/g de sementeÉ
GA7/col 22.2-1	14,2	14,89	20,2
GA7/col 22.2-2	14,3	15,02	20,5
GA7/col 22.2-3	14,0	15,92	21,2
GA7/col 10.15-1	8,7	30,23	25,06
GA7/col 10.15-2	8,6	31,25	25,77
GA7/col 10.15-3	8,8	31,70	26,49

ExemploÓ3.ÓExpressãoÓestávelÓdeÓumaÓviaÓdeÓDHAÓtransgénicaÓemÓsementesÓdeÓ*Camelina sativa*

O vetor binário pJP3416-GA7 como descrito acima foi introduzido na estirpe AGL1 de *A. tumefaciens* e células de uma cultura da *Agrobacterium* transformada usadas para tratar plantas com flor de *C. sativa* usando um método de imersão floral para transformação (Lu and Kang, 2008É. Após o crescimento e maturação das plantas, as sementes das plantas T_1 tratadas foram colhidas, semeadas no solo e as plantas resultantes tratadas por pulverização com o herbicida BASTA para selecionar plantas que eram transgénicas para, e que expressavam, o gene marcador selecionável *bar* presente no T-ADN de pJP3416-GA7. As plantas sobreviventes T_1 que foram tolerantes ao herbicida foram cultivadas até à maturidade depois de deixá-las passar por autofecundação, e as sementes T_2 resultantes foram colhidas. Foram obtidas cinco plantas transgénicas, apenas três das quais continham todo o T-ADN.

O lípido foi extraído a partir de um agrupamento de aproximadamente 20 sementes a partir de cada uma das três

plantas que continham todo o T-ADN. Duas das amostras agrupadas continham níveis de DHA muito baixos, quase indetetáveis, mas o terceiro agrupamento continha cerca de 4,7 % de DHA (Quadro 12É. Por conseguinte, o lípido foi extraído a partir de 10 sementes T_2 individuais desta planta e a composição de ácidos gordos analisada por GC. Os dados de composição de ácidos gordos das sementes individuais para esta linhagem transformada também são mostrados no Quadro 11. Os dados compilados dos perfis lipídicos totais de sementes (Quadro 11É são mostrados no Quadro 12.

QuadroÓ11. Composição de ácidos gordos de lípidos totais de semente a partir de sementes de *Camelina sativa* T_2 transgénicas transformadas com o T-ADN de pJP3416-GA7. É mostrada a composição de ácidos gordos para um lote de sementes agrupado (FD5.46É e para 10 sementes únicas classificadas (da esquerda para direitaÉ de DHA mais alto ao mais baixo.

ÁcidoÓgordo	FD5.46 agrupado	óÓ2	óÓ4	óÓ8	óÓ7	óÓ9	óÓ1	óÓ3	óÓ5	óÓ6	óÓ10
14:0	0	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
16:0	11,6	12,1	12,3	12,1	13,2	12,3	12,8	11,9	11,4	11,5	11,7
16:1	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2
16:3	0,3	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	3,7	3,3	3,2	3,2	3,0	3,1	3,2	3,3	3,1	3,2	3,2
18:1	10,8	8,0	8,0	8,6	8,5	9,4	11,0	10,2	8,3	9,4	8,6
18:1d11	1,7	1,3	1,4	1,4	1,7	1,4	1,5	1,3	1,3	1,3	1,3
18:2	24,7	18,2	19,5	19,2	18,5	20,1	23,8	32,2	30,3	29,8	31,6

18:3ω3	27,4	26,7	26,6	27,3	28,9	28,2	27,4	28,3	29,2	29,5	28,2
18:3ω6	0,2	1,4	0,3	0,3	0,4	0,2	0,5	0,0	0,5	0,4	0,6
20:0	1,6	1,4	1,3	1,4	1,2	1,4	1,4	1,8	2,1	1,9	2,0
18:4ω3	2,2	6,8	6,4	5,7	7,2	5,7	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0
20:1d11	5,3	4,4	4,6	4,8	3,3	4,1	3,5	4,4	6,1	5,8	5,5
20:1iso	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,5	0,6	0,5	0,5
20:2ω6	0,8	0,8	0,9	0,8	0,6	0,8	0,7	1,3	1,5	1,4	1,4
20:3ω3	0,6	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8	0,7	0,6	0,7	0,7	0,6
22:0	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6
20:4ω3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
22:1	1,1	1,1	1,2	1,1	0,5	0,9	0,8	1,6	2,2	1,9	2,0
20:5ω3	0,7	1,3	1,6	1,5	1,6	1,1	1,7	0,0	0,0	0,0	0,1
22:2ω6	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3	0,2	0,2
22:4ω6+22:3ω3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,0	0,3	0,0	0,4	0,6	0,5	0,5
24:0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,3	0,0	0,4	0,4	0,4	0,4
24:1	0,3	0,4	0,4	0,3	0,0	0,3	0,0	0,5	0,6	0,5	0,5
22:5ω3	0,3	1,1	1,2	1,1	1,1	0,9	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
22:6ω3Ó	**4,7Ó**	**9,0Ó**	**8,5Ó**	**8,3Ó**	**8,3Ó**	**7,1Ó**	**4,9Ó**	**0,0Ó**	**0,0Ó**	**0,0Ó**	**0,0Ó**

Quadro 12. Dados compilados a partir dos perfis de lípidos totais de sementes a partir das sementes transgénicas mostradas no Quadro 11. Os cálculos não incluem os "ácidos gordos secundários" no Quadro 11.

Parâmetro	FD5.46 agrupado	#2	#4	#8	#7	#9	#1	#3	#5	#6	#10
w3 total (% de FA total)	36,1	46	45,4	45	48,2	44,2	40,1	28,9	29,9	30,2	28,9
w6 total (% de FA total)	25,8	20,4	20,7	20,3	19,5	21,1	25	33,7	32,6	31,8	33,8
Razão de w3/w6	1,40	2,25	2,19	2,22	2,47	2,09	1,60	0,86	0,92	0,95	0,86
Razão de w6/w3	0,71	0,44	0,46	0,45	0,40	0,48	0,62	1,17	1,09	1,05	1,17
w3 novo total (% de FA total)	8,1	18,5	18	16,9	18,6	15,2	12	0	0	0	0,1
w6 novo total (% de FA total)	1,1	2,2	1,2	1,1	1	1	1,2	1,5	2,3	2	2,2
Razão de w3/w6 novos	7,36	8,41	15,00	15,36	18,60	15,20	10,00				0,05
Razão de w6/w3 novos	0,14	0,12	0,07	0,07	0,05	0,07	0,10				22,00
Eficiência de OA para EPA	8, %	15,6 %	15,5 %	15,1 %	15,1 %	12,8 %	10,5 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,1 %
Eficiência de OA para DHA	6,7 %	12,3 %	11,6 %	11,5 %	11,4 %	10,0 %	7,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Eficiência de LA para EPA	9,2 %	17,2 %	17,1 %	16,7 %	16,2 %	13,9 %	11,4 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,2 %
Eficiência de LA para DHA	7,6 %	13,6 %	12,9 %	12,7 %	12,3 %	10,9 %	7,5 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %

Eficiência de ALA para EPA	15,3 %	24,8 %	24,9 %	24,2 %	22,8 %	20,6 %	18,5 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,3 %
Eficiência de ALA para DHA	13,3 %	19,6 %	18,7 %	18,4 %	17,2 %	16,1 %	12,2 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Saturados totais	17,6	17,8	17,8	17,6	18	17,8	18,1	18,2	17,7	17,8	18,1
Monoinsaturados totais	19,8	15,5	16	16,6	14,3	16,6	16,8	18,7	19,3	19,6	18,6
Polinsaturados totais	62,5	66,6	66,4	65,6	67,7	65,6	65,1	63	63,1	62,5	63,2
C20 total	9,6	9,3	9,8	9,9	8,1	8,9	8,5	8,6	11	10,3	10,1
C22 total	5,4	10,3	10	9,7	9,4	8,3	5,7	0,6	8,9	0,7	0,7
Razão de C20/C22	1,78	0,90	0,98	1,02	0,86	1,07	1,49	14,33	12,22	14,71	14,43

O DHA estava presente em seis das 10 sementes individuais. As outras quatro sementes não tinham DHA e foram presumidas como sendo segregantes nulos que não tinham o T-ADN, com base na característica de hemizigoto da inserção do T-ADN na planta parental. O lípido extraído de uma única semente com o nível mais elevado de DHA tinha 9,0 % de DHA enquanto a soma das percentagens para EPA, DPA e DHA foi de 11,4 %. A soma das percentagens para os ácidos gordos ω3 novos produzidos nesta semente como resultado da transformação (SDA, ETrA, ETA, EPA, DPA, DHAÉ foi de 19,3 %, enquanto a soma correspondente para os ácidos gordos ω6 novos (GLA, EDA, DGLA, ARA e quaisquer produtos de alongamento de ω6É foi de 2,2 % - apenas GLA e EDA foram detetados como os ácidos gordos ω6 novos. A razão de ω6 FA total (incluindo LAÉ para ω3 FA (incluindo ALAÉ foi encontrada como sendo de 0,44. A razão de ω6 FA novo (excluindo LAÉ para ω3 FA novo (excluindo ALAÉ na linhagem com os níveis mais elevados de DHA foi de 0,12. O nível de ácidos gordos saturados totais foi cerca de 17,8 % e o nível de ácidos gordos monoinsaturados foi cerca de 15,5 %. O nível de ácidos gordos ω6 totais foi cerca de 20,4 % e o nível de ácidos gordos ω3 foi cerca de 46 %. As eficiências de conversão gerais foram calculadas como sendo: OA para EPA = 15,6 %, OA para DHA = 12,3 %, LA para EPA = 17,2 %, LA para DHA = 13,6 %, ALA para EPA = 24,8 %, ALA para DHA = 19,6 %.

Sementes homozigotas desta linhagem foram obtidas na geração T_4. Até 10,3 % DHA foram produzidos no evento FD5-46-18-110, com uma média de 7,3 % de DHA observado em toda a geração T_4.

A semente homozigota foi plantada em várias estufas para gerar um total de mais de 600 plantas individuais. O óleo sendo extraído da semente usando uma variedade de métodos incluindo as extrações soxhlet, com acetona e hexano.

Uma vez que o número de linhagens independentemente transformadas de *C. sativa* obtidas como descrito acima foi baixo, são realizadas outras experiências para transformar *C. sativa* com pJP3416-GA7. Os inventores preveem que níveis de DHA de mais de 10 % como uma percentagem do total de ácidos gordos no óleo da semente serão alcançados em linhagens mais transformadas, e plantas que são homozigotas para o T-ADN até 20 % de DHA. Vinte eventos de *C. sativa* GA7_modH foram gerados e a semente foi analisada quanto ao teor de DHA. Três eventos de GA7_modB foram gerados e a análise das sementes T_1 do evento CMD17.1 revelou um teor de DHA de sementes agrupado de 9,8 %.Verificou-se que o valor de DHA em semente única mais elevado foi de 13,5 %.

Exemplo 4. Expressão estável de vias de DHA transgénicas em sementes de *Brassica napus*

Transformação de *B. napus* e análise da composição de ácidos gordos usando um vetor único

O vetor binário pJP3416-GA7 foi usado para gerar plantas *Brassica napus* transformadas e sementes das plantas. O vetor pJP3416-GA7 como descrito acima foi introduzido na estirpe AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* através de procedimentos padrão de eletroporação. As culturas de células de *Agrobacterium* transgénicas foram deixadas crescer durante a noite a 28 °C em meio LB com agitação a 150 rpm. As células bacterianas foram recolhidas por centrifugação a 4000 rpm durante 5 minutos, lavadas com meio AB Winans (Winans, 1988) e ressuspensas em 10 ml de meio AB Winans (pH 5,2) e o crescimento continuou durante a noite na presença de canamicina (50 mg/l), rifampicina (25 mg/l) e acetosiringona a 100 μM. Duas horas antes da infeção das células de *Brassica*, espermidina (120 mg/l) foi adicionada e a densidade final das bactérias ajustada para uma DO 600 nm de 0,3-0,4 com meio AB fresco. Pecíolos cotiledonares recentemente isolados de mudas de *Brassica napus* com 8 dias de idade cultivadas em 1/2 MS (Murashige e

Skoog, 1962É ou segmentos de hipocotil pré-condicionados durante 3-4 dias no meio MS com tidiazuron a 1 mg/l (TDZÉ e ácido a-naftalenoacético a 0,1 mg/l (NAAÉ foram infetados com 10 ml de culturas de *Agrobacterium* durante 5 minutos. Os explantes infetados com *Agrobacterium* foram então manchados em papel de filtro estéril para remover o excesso de *Agrobacterium* e transferidos para o meio de cultivo (meio MS com TDZ 1 mg/l, NAA 0,1 mg/l e acetosiringona 100 µMÉ suplementado com ou sem diferentes antioxidantes (L-cisteína 50 mg/l e ascórbico 15 mg/lÉ. Todas as placas foram seladas com parafilme e incubadas no escuro a 23-24 °C durante 48 horas.

Os explantes tratados foram então lavados com água destilada estéril contendo cefotaxima a 500 mg/l e timentina a 50 mg/l durante 10 minutos, enxaguados em água destilada esterilizada durante 10 minutos, secos em papel de filtro estéril, transferidos para meio de pré-seleção (MS contendo TDZ a 1 mg/l, NAA a 0,1 mg/l, sulfato de adenina a 20 mg/l (ADSÉ, $AgNO_3$ a 1,5 mg/l, cefotaxima a 250 mg/l e timentina a 50 mg/lÉ e cultivados durante cinco dias a 24 °C com um fotoperíodo de 16 h/8 h. Os mesmos foram então transferidos para meios de seleção (MS contendo TDZ a 1 mg/l, NAA a 0,1 mg/l, ADS a 20 mg/l, $AgNO_3$ a 1,5 mg/l, cefotaxima a 250 mg/l e timentina a 50 mg/lÉ com glufosinato-amónio a 1,5 mg/l como o agente para a seleção das células transformadas e cultivados durante 4 semanas a 24 °C, com um fotoperíodo de 16h/8h com uma subcultura quinzenal para o mesmo meio. Explantes com calo verde foram transferidos para meio de iniciação de broto (MS contendo quinetina a 1 mg/l, ADS a 20 mg/l, $AgNO_3$ a 1,5 mg/l, cefotaxima a 250 mg/l, timentina a 50 mg/l e glufosinato de amónio de 1,5 mg/lÉ e cultivados durante mais 2-3 semanas. Os brotos emergindo dos explantes resistentes foram transferidos para meio de alongamento de broto (meio MS com ácido giberélico a 0,1 mg/l, ADS a 20 mg/l, $AgNO_3$ a 1,5

mg/l, cefotaxima a 250 mg/l e glufosinato de amónio a 1,5 mg/lÉ e cultivadas durante mais duas semanas. Brotos saudáveis de 2-3 cm de comprimento foram selecionados e transferidos para o meio de enraizamento (meio MS contendo NAA a 1 mg/l, ADS a 20 mg/l, $AgNO_3$ a 1,5 mg/l e cefotaxima de 250 mg/lÉ e cultivados durante 2-3 semanas. Brotos bem estabelecidos com raízes foram transferidos para vasos contendo mistura de crescimento de mudas e deixados crescer num armário de crescimento duas semanas e posteriormente transferidos para uma estufa. Aproximadamente 40 (T_0É plantas transformadas com a construção GA7 foram obtidas por este método.

As plantas foram cultivadas até à maturidade depois de se autofertilizarem. As sementes obtidas das plantas transformadas foram analisadas quanto à composição de ácidos gordos nos seus óleos de semente conforme descrito no Exemplo 1. Os dados para uma linhagem transformada com o nível mais elevado de DHA são mostrados no Quadro 13. Os níveis DHA em média foram significativamente menores no óleo de semente das sementes de *B. napus* transformadas com o T-ADN de pJP3416 GA7 do que nas sementes de *A. thaliana* (Exemplo 2É ou sementes de *Camelina* (Exemplo 3É transformadas com a mesma construção. O maior nível de DHA em aproximadamente 40 linhagens foi encontrado como sendo 1,52 % com a maioria das linhas transgénicas com DHA detetável. Observou-se que havia uma acumulação substancial de ALA, cerca de 35 % dos ácidos gordos totais, nestas sementes que não estava a ser convertido eficientemente para SDA ou os produtos seguintes na via.

A análise do perfil de ácidos gordos de sementes de *B. napus* única de um evento T_1, CT125-2, foi realizada para determinar melhor a quantidade de DHA produzido em sementes transgénicas. As sementes contiveram entre 0 % (sementes nulasÉ e 8,5 % de DHA (Quadro 13É.

Algumas das sementes da linhagem de planta CT116, bem

como outras linhagens transgénicas mostrando a produção de DHA foram semeadas para produzir plantas descendentes. RT-PCR foi realizada sobre o ARN total isolado a partir de embriões em desenvolvimento a partir destas plantas a fim de determinar porque a construção GA7 teve um mau resultado quanto à produção de DHA em relação à *A. thaliana* e *C. sativa* transgénica com a mesma construção e mau em relação à combinação dos genes em pJP3115 e pJP3116 (abaixoÉ. RT-PCR foi realizada sobre o ARN total usando um kit de RT-PCR de uma etapa (InvitrogenÉ e iniciadores específicos de genes direcionados para cada transgene. Isto confirmou que cada um dos genes na construção GA7 foi bem expresso nos transformantes de *B. napus*, exceto para a Δ6-dessaturase, que foi mal expressa na maioria das sementes transformadas. Os outros genes dessa construção funcionaram bem nas sementes de *B. napus* e *A. thaliana*, por exemplo, as Δ12 e Δ15-dessaturases que funcionaram para produzir níveis aumentados de LA e ALA nas sementes, enquanto diminuiu os teores de ácido oleico. Um gel representante de RT-PCR é mostrado na Figura 7, que mostra claramente a baixa expressão da Δ6-dessaturase em relação a outros transgenes de pJP3416-GA7.

Plantas e sementes transgénicas que são homozigotos para os transgenes são gerados através da plantação da descendência a partir das linhagens com o DHA mais alto.

QuadroÓ13. Composição de ácidos gordos como uma percentagem dos ácidos gordos totais no óleo de semente a partir de semente de *Brassica napus* T_1 transformada com pJP3416-GA7, linhagens CT116-11 e CT-125-2 em comparação com o tipo selvagem (não transformadoÉ de controlo. 22:6ω3 é DHA. Os dados a partir de sementes de *B. napus* CT125-2 únicas são indicados por "SS".

	Controlo	CT116-11	CT125-2	CT125-2Ó62ÓSS	CT125-2Ó63ÓSS	CT125-2Ó 610ÓSS
14:0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1

16:0	4,3	7,2	5,2	6,5	4,7	7,7
16:1	0,2	0,5	0,4	0,3	0,3	0,8
16:3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
18:0	2,1	2,2	2,4	2,3	2,3	2,8
18:1d9	59,1	27,0	38,1	34,0	19,3	14,8
18:1d11	3,7	6,6	4,2	4,4	4,3	9,6
18:2	19,7	14,1	16,6	13,9	10,2	10,2
18:3ω 3	8,3	35,2	27,7	34,1	49,5	37,9
20:0	0,6	0,5	0,6	0,4	0,3	0,7
18:4ω3	0,0	0,9	0,3	0,5	0,6	2,6
20:1d11	1,2	1,1	1,0	1,0	0,8	0,6
20:1is0		0,2		0,1		0,2
20:2ω6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
20:3ω3		1,3	0,7	0,8	1,6	0,9
22:0	0,3	0,4	0,3	0,1	0,1	0,4
20:4ω3		0,1	0,3	0,4	0,6	0,5
22:1						
20:5ω3					0,1	0,3
22:3ω3					0,1	
24:0	0,2	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3
24:1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1
22:5ω3		0,1	0,1	0,1	0,1	0,5
22:6ω3		**1,52**	**1,2**	**1,3**	**2,7**	**8,5**

Transformação de B. napus e análise da composição de ácidos gordos usando dois vetores

Noutra experiência em *B. napus* e como um formato alternativo para a introdução de transgenes, os vetores binários pJP3115 e pJP3116, conforme descrito no documento WO 10 2010/057246 foram usados para gerar separadamente plantas *B. napus* transformadas e sementes transformadas foram obtidas a partir das plantas. O T-ADN em pJP3115 compreendeu genes quiméricos que codificam Δ12-dessaturase de *Crepis palestina*, Δ6-dessaturase de *Micromonas pusilla*, Δ6-elongase de *Pyramimonas cordata* e Δ5-dessaturase de *Pavlova salina* e o T-ADN em pJP3116 continha genes

quiméricos que codificam Δ15-dessaturase de *Perilla frutescens*, Δ5-elongase de *Pyramimonas cordata* e Δ4-dessaturase de *Pavlova salina*. Os dois T-ADNs, quando presentes juntos e expressos em sementes em desenvolvimento, formaram uma via de 7 genes para a produção de DHA de ácido oleico produzido endogenamente. Estes vetores foram introduzidos na estirpe AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* através de procedimentos padrão de eletroporação e as células transformadas usadas independentemente para transformar *B. napus* usando o método conforme descrito acima para gerar plantas T_0 transformadas estavelmente. Transformantes 29 pJP3115 e 19 pJP3116 foram obtidos e estas plantas foram deixadas crescer até à maturidade e as sementes obtidas após autofertilização foram analisadas quanto à composição de ácidos gordos no seu óleo de semente. Esperou-se que a transformação com o T-ADN de pJP3115 resultasse na produção de EPA a partir de ALA produzido endogenamente enquanto se esperou que a transformação com o T-ADN de pJP3116 resultasse na produção aumentada de ALA a partir de LA. Várias plantas foram identificadas que apresentaram estes fenótipos. A maioria dos eventos apresentaram um fenótipo de OA diminuído / LA aumentado devido à Δ12 dessaturação com um baixo nível de produção de EPA. Até 2,6 % de EPA foram observados em sementes combinadas transgénicas pJP31115. Da mesma forma, a maioria dos eventos pJP3116 demonstrou ter um fenótipo de ALA elevado devido à atividade da Δ15-dessaturase. Até 18,5 % de ALA foi encontrado em sementes combinadas transformadas com o T-ADN de pJP3116.

As plantas T_1 a partir das linhagens com os mais altos níveis de EPA e ALA foram cruzadas e a semente dos descendentes (F1É de 24 eventos recuperada e analisada quanto ao teor de DHA. DHA foi encontrado em 17 destes eventos com até 1,9 % de DHA encontrado nas sementes combinadas destes eventos. A análise de semente única foi

realizada para determinar o intervalo de produção de DHA - os dados são mostrados no Quadro 14. Um intervalo grande de níveis de DHA foi observado nos descendentes cruzados, provavelmente devido à natureza heterozigota dos T-ADNs nas plantas parentais, de forma que algumas sementes não receberam ambos os T-ADNs. Até 6,7 % DHA foi observado em lípidos de sementes totais.

QuadroÓ14. Composição de ácidos gordos como uma percentagem de ácidos gordos totais no óleo de sementes únicas F1 de *B. napus* que foram provenientes de um cruzamento de plantas transgénicas para o T-ADN de pJP3115 com plantas transgénicas para o T-ADN a partir de pJP3116. B1, B2 e B4 designam eventos. 0,0 = não detetável pelo método de GC.

	B1.1	B1.2	B1.3	B1.4-g	B1.5-g	B2.1	B2.2	B2.3g	B2.4g	B2.5g	B3.1	B3.2
14:0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
16:0	6,6	6,4	4,5	12,3	7,9	5,1	5,0	10,1	8,5	6,8	5,3	7,2
16:1	0,4	0,5	0,2	1,0	0,6	0,4	0,4	0,6	1,1	0,5	0,5	0,6
16:3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2
18:0	2,3	2,6	2,2	1,6	2,9	2,9	3,4	2,2	1,8	2,9	3,4	2,4
18:1	34,1	39,3	46,9	14,9	20,7	41,6	46,3	14,4	23,4	38,3	43,6	32,0
18: 1d11	4,6	5,8	2,7	6,8	6,2	3,8	4,9	5,9	8,7	4,5	5,5	5,1
18:2	33,6	30,7	30,4	29,2	34,4	31,7	27,7	33,2	23,9	33,3	27,9	33,4
18:3ω6	0,2	0,3	0,1	0,4	0,4	0,2	0,2	0,7	0,1	0,2	0,2	0,3
18:3ω3	10,3	7,1	7,7	18,7	14,9	8,2	5,9	14,8	28,1	6,3	7,3	10,0
20:0	0,6	0,7	0,6	0,5	0,7	0,8	0,9	0,6	0,4	0,7	0,9	0,7
18:4ω3	0,2	0,1	0,1	0,8	0,5	0,2	0,2	0,8	0,0	0,2	0,2	0,2

20:1d11	1,0	1,1	1,1	0,7	0,8	1,1	1,1	0,5	0,9	1,1	1,1	0,9
20:1iso	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1
20:2ω6	0,4	0,3	0,2	0,5	0,5	0,4	0,3	0,4	0,5	0,5	0,3	0,5
20:3ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:4ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
20:3ω3	1,8	1,6	1,1	2,8	2,1	1,1	1,0	2,7	0,7	1,4	0,9	1,6
22:0	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4
20:4ω3	0,3	0,2	0,2	0,4	0,4	0,1	0,1	0,5	0,0	0,2	0,1	0,2
22:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:5ω3	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
22:2ω6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:4ω6	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,4	0,2	0,2	0,1	0,2
24:0	0,3	0,4	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3
22:5ω6	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,5	0,0	0,2	0,1	0,2
24:1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
22:5ω3	0,7	0,7	0,3	2,1	1,6	0,3	0,4	3,2	0,0	0,5	0,4	1,2
22:6ω3Ó	**1.4Ó**	**1.0Ó**	**0.5Ó**	**5.5Ó**	**3.9Ó**	**0.8Ó**	**0.7Ó**	**6.7Ó**	**0.0Ó**	**1.1Ó**	**0.8Ó**	**2.0Ó**

QuadroÓ15. Dados compilados dos perfis de lípidos totais de sementes a partir das sementes transgénicas mostradas no Quadro 14. Os cálculos não incluem os "ácidos gordos secundários" no Quadro 14.

ParâmetroÓ	B1.1	B1.2	B1.3	B1.4-g	B1.5-g	B2.1	B2.2	B2.3g	B2.4g	B2.5g	B3.1
w3ÓtotaléÓ(%Ódo FAÓtotal)	4,6	3,9	2,3	12,1	9	2,7	2,6	14,8	0,8	3,6	2,6
w6ÓtotaléÓ(%Ódo FAÓtotal)	44,5	38,5	38,5	48,8	50,3	40,5	34,1	49,4	52,7	40,5	35,7
RazãoÓdeÓw3/w6	0,10	0,10	0,06	0,25	0,18	0,07	0,08	0,30	0,02	0,09	0,07
RazãoÓdeÓw6/w3	9,67	9,87	16,74	4,03	5,59	15,00	13,12	3,34	65,88	11,25	13,73
w3ÓnovoÓtotal (%ÓdeÓFAÓtotal)	2,6	2	1,1	8,9	6,5	1,4	1,4	11,4	0	2	1,5
w6ÓnovoÓtotal (%ÓdeÓFAÓtotal)	10,5	7,5	7,9	19,1	15,4	8,4	6,1	15,8	28,3	6,7	7,5
RazãoÓdeÓw3/w6 novos	0,25	0,27	0,14	0,47	0,42	0,17	0,23	0,72	0,00	0,30	0,20
RazãoÓdeÓw6/w3 novos	4,04	3,75	7,18	2,15	2,37	6,00	4,36	1,39		3,35	5,00
EficiênciaÓde OAÓparaÓEPA	2,5 %	2,1 %	0,9 %	10,1 %	6,9 %	1,3 %	1,3 %	12,8 %		1,9 %	1,4 %
EficiênciaÓde OAÓparaÓDHA	1,7 %	1,2 %	0,6 %	7,2 %	4,8 %	0,9 %	0,8 %	8,5 %		1,3 %	1,0 %
EficiênciaÓde LAÓparaÓEPA	4,3 %	4,0 %	2,0 %	12,6 %	9,4 %	2,5 %	3,0 %	15,7 %		3,6 %	3,1 %
EficiênciaÓde	2,9 %	2,4 %	1,2 %	9,0 %	6,6 %	1,9 %	1,9 %	10,4 %		2,5 %	2,1 %

LAÓparaÓDHA											
EficiênciaÓde ALAÓparaÓEPA	47,7 %	44,7 %	36,4 %	68,1 %	65,9 %	44,0 %	45,8 %	72,1 %		47,1 %	50,0 %
EficiênciaÓde ALAÓparaÓDHA	31,8 %	26,3 %	22,7 %	48,7 %	45,9 %	32,0 %	29,2 %	47,9 %		32,4 %	33,3 %
Saturados totais	10,2	10,6	7,9	15,1	12,4	9,6	10,2	13,7	11,6	11,3	10,6
Monoinsaturados totais	40,4	47	51,1	23,8	28,7	47,2	53	21,8	34,7	44,7	51
Polinsaturados totais	49,2	42,5	40,9	61	59,4	43,3	36,8	64,3	53,7	44,2	38,4
C20Ótotal	4,2	4	3,2	5,1	4,7	3,6	3,5	5,1	2,8	4	3,4
C22Ótotal	2,6	2,5	1,3	8,3	6,4	1,7	1,8	11,1	0,5	2,4	1,9
RazãoÓde C20/C22	1,62	1,60	2,46	0,61	0,73	2,12	1,94	0,46	5,60	1,67	1,79

Os dados compilados dos perfis de lípidos totais (Quadro 14É são mostrados no Quadro 15. A partir dos dados no Quadro 15, a razão de ω6 FA total (incluindo LAÉ para ω3 FA (incluindo ALAÉ na semente com o mais alto nível de DHA foi 3,34. A razão de ω6 FA novo (excluindo LAÉ para ω3 FA novo (excluindo ALAÉ foi 1,39. O nível de ácidos gordos saturados totais foi cerca de 13,7 % e o nível de ácidos gordos monoinsaturados foi cerca de 21,8 %. O nível de ácidos gordos ω6 totais foi cerca de 46,4 % e o nível de ácidos gordos ω3 foi cerca de 14,8 %. As eficiências de conversão gerais foram calculadas como sendo: OA para EPA = 12,8 %, OA para DHA = 8,5 %, LA para EPA = 15,7 %, LA para DHA = 10,4 %, ALA para EPA = 72,1 %, ALA para DHA = 47,9 %. Acredita-se que a redução da eficiência da conversão dos

ácidos gordos ω6 para ácidos gordos ω3 observada nesta experiência com a combinação de pJP3115 e pJP3116 foi devida a uma menor eficiência da Δ15-dessaturase vegetal em comparação com o a Δ15/ω3 dessaturase fúngica (Exemplos 2 e 3É quando combinadas com os genes para conversão de ALA em DHA.

Descendentes de linhagens contendo DHA que são homozigotos para todos os transgenes introduzidos são gerados para análise.

ExemploÓ5.ÓModificaçõesÓparaÓT-ADNsÓqueÓcodificamÓviasÓdeÓDHAÓemÓsementesÓdeÓplantasÓ

A fim de melhorar o nível de produção de DHA em *B. napus* além dos níveis descritos no Exemplo 4, os vetores binários pJP3416-GA7-modA, pJP3416-GA7-modB, pJP3416-GA7-modC, pJP3416-GA7-modD, pJP3416 GA7-modE e pJP3416-GA7-modF foram construídos como se segue. Estes vetores binários foram variantes da construção pJP3416-GA7 descrita no Exemplo 2 e foram projetados para aumentar ainda mais a síntese de DHA em sementes de planta, particularmente melhorando as funções da Δ6-dessaturase e Δ6-elongase. Observou-se que SDA se acumula em algumas sementes transformadas com a construção GA7 devido a uma eficiência de alongamento relativamente baixa em comparação com a Δ5-elongase, portanto, entre outras modificações, as duas posições do gene elongase foram trocadas no T-ADN.

As duas sequências que codificam elongase em pJP3416 GA7 foram trocadas nas suas posições no T-ADN para produzir pJP3416-GA7-modA clonando primeiro uma novo cassete de Δ6-elongase de *P. cordata* entre os sítios Sbf1 de pJP3416-GA7 para substituir a cassete de Δ5-elongase de *P. cordata*. Esta construção foi ainda modificada e trocando o promotor FP1 dirigindo a Δ6-dessaturase de *M. pusilla* com um promotor Cn12 conlinina (pLuCn12É para produzir pJP3416-GA7-modB. Esta modificação foi feita numa tentativa de aumentar a expressão de Δ6-dessaturase e, assim, a

eficiência da enzima. Pensava-se que o promotor Cn12 podia produzir maior expressão do transgene em *B. napus* que o promotor truncado de napina. pJP3416-GA7-modC foi produzido pela adição de uma segunda cassete de Δ6-dessaturase de *M. pusilla* com a utilização de um codão ligeiramente diferente (SEQ ID NO: 15É e dirigido pelo promotor FP1, que foi inserido no sítio *Pme*I no interior da fronteira direita de pJP3416-GA7-modB. A segunda cassete de Δ6-dessaturase foi adicionada ao pJP3416-GA7-modB e pJP3416-GA7-modF para aumentar o nível de expressão de Δ6-dessaturase e estender o período de tempo durante o desenvolvimento de sementes para a expressão de Δ6-dessaturase pela utilização de vários promotores. Utilizações de codões diferentes foram aplicadas em duas sequências de nucleótidos para resultar na tradução da mesma sequência de proteína sem arriscar a cossupressão de regiões semelhantes de codificação dentro do mesmo T-ADN. pJP3416-GA7-modD e pJP3416 GA7-modE foram variações semelhantes em que uma terceira sequência MAR, correspondente aos nucleótidos 16649-17816 da SEQ ID NO: 1, foi adicionada ao pJP3416-GA7 e pJP3416-GA7-modB, respetivamente, no sítio *Pme*I. pJP3416-GA7-modF foi produzido pela adição de uma segunda cassete de Δ6-dessaturase de *M. pusilla* que contém a sequência de nucleótidos de Δ6-dessaturase nativa e conduzida pelo promotor FP1 no sítio *Pme*I na fronteira direita do pJP3416-GA7-modB. pJP3416-GA7-modG foi preparado primeiro pela substituição da cassete de *M. pusilla* com uma cassete de Cn12:Δ5-elongase de *P. cordata* por clonagem de restrição nos sítios *Asc*I-*Pac*I. pJP3416-GA7-modG foi então preparado substituindo a cassete FAE1:Δ5-elongase de *P. cordata* original com uma cassete FAE1:Δ6-dessaturase de *M. pusilla* por clonagem de restrição dos sítios de *Sbf*I. As sequências de nucleótidos dos T-ADNs de cada uma destas construções genéticas são mostradas como: pJP3416-GA7-modB (SEQ ID NO:2É, pJP3416-GA7-modC (SEQ ID NO:3É, pJP3416-GA7-modD

(SEQ ID NO:4É, pJP3416-GA7-modE (SEQ ID NO:5É, pJP3416-GA7-modF (SEQ ID NO:6É e pJP3416-GA7-modG (SEQ ID NO:7É.

Os vetores binários pJP3416-GA7-modB, pJP3416-GA7-modC, pJP3416-GA7-modD, pJP3416 GA7-modE, pJP3416-GA7-modF e pJP3416-GA7-mosG são usados para gerar embriões somáticos de *Brassica* transformados e plantas e sementes de descendentes de *Brassica napus*, *Camelina* sativa e *Arabidopsis thaliana*. Os dados para pJP3416-GA7-modB são mostrados no Exemplo a seguir.

Oito eventos transgénicos pJP3416-GA7-modB *A. thaliana* e 15 eventos transgénicos pJP3416-GA7-modG *A. thaliana* foram gerados. Entre 3,4 % e 7,2 % DHA em sementes de pJP3416-GA7-modB combinadas foram observadas e entre 0,6 % e 4,1 % DHA em sementes pJP3416-GA7-modG T_2 combinadas foram observadas. Vários dos eventos pJP3416-GA7-modB maiores foram semeados em meios selecionáveis e mudas sobreviventes levadas até à próxima geração. A semente está a ser analisada quanto ao teor de DHA. Uma vez que as sementes T_1 combinadas representavam as populações que foram segregadas para os transgenes e incluíam quaisquer segregantes nulos, espera-se que as sementes homozigotas das plantas descendentes tenham níveis aumentados de DHA, até 20 % do teor total de ácidos gordos no óleo de semente. As outras construções modificadas foram usadas para transformar *A. thaliana*. Embora apenas um pequeno número de linhagens transformadas tenha sido obtido, nenhum resultou em níveis mais elevados de DHA do que a construção modB.

A construção pJP3416-GA7-modB também foi usada para gerar plantas *B. napus* transformadas da cultivar Oscar e no cultivo de uma linhagem denominada NX005. Dez plantas transformadas independentes (TOÉ foram obtidas até agora para a transformação Oscar, e 20 linhagens independentes para NX005. A semente (semente T1É foi colhida a partir destas linhagens transgénicas. Combinados de sementes foram testados quanto a níveis de DHA no óleo de semente e duas

linhagens que mostraram os mais altos níveis foram selecionadas, estas foram designadas linhagens CT132.5 (no cultivar OscarÉ e CT133.15 (em NX005É. Vinte sementes de CT132.5 e 11 sementes de CT133.15 foram embebidas e, depois de dois dias, o óleo foi extraído de meio cotilédone de cada uma das sementes individuais. As outras metades dos cotilédones com eixos embrionários foram mantidos e cultivados em meios para manter as linhagens descendentes específicas. A composição de ácidos gordos no óleo foi determinada; os dados são mostrados no Quadro 16 para CT132.5. O nível de DHA em dez das 20 sementes analisadas estava no intervalo de 7-20 % do teor total de ácidos gordos conforme determinado pela análise de GC. Outras sementes tinham menos do que 7 % de DHA e podem ter contido uma cópia parcial (incompletaÉ do T-ADN partir de pJP3416-GA7-modB. A linhagem transgénica pareceu conter várias inserções de transgene que foram geneticamente desligadas. As sementes da linhagem transgénica CT133.15 apresentou níveis de DHA no intervalo de 0-5 %. As sementes sem DHA eram suscetíveis de ser segregantes nulos. Estes dados confirmaram que a construção modB teve bom desempenho para a produção de DHA na semente de canola.

As construções pJP3416-GA7-modB e pJP3416-GA7-modF também foram utilizadas para gerar plantas *Camelina sativa* transformadas. Pelo menos 24 plantas transformadas independentes (TOÉ foram obtidas e examinadas mais detalhadamente por análise de descendência. A semente (semente T1É foi colhida a partir destas linhagens transgénicas. Combinados de sementes foram testados quanto a níveis de DHA no óleo de semente, e 6 linhagens que mostraram os mais altos níveis de DHA (entre 6 % e 9 %É foram selecionadas. Os níveis de DHA em 20 sementes T1 de cada linhagem foram analisados - a maioria das sementes apresentou níveis de DHA no intervalo de 6-14 % do teor total de ácidos gordos conforme determinado pela análise de

GC. A composição de ácidos gordos no óleo foi determinada; os dados são mostrados no Quadro 17 para algumas sementes transgénicas. Estes dados confirmaram que as construções modB e modF tiveram bom desempenho para a produção de DHA na semente de *Camelina*.

QuadroÓ16. Perfis de ácidos gordos dos meios cotilédones de sementes de *B. napus* transgénicas T1 de germinação contendo a construção modB. Até 18,1 % DHA foi observado com numerosas amostras contendo mais do que 10 % DHA.

Semente	14:0	16:0	16:1d3?	16:1	16:3	18:0	18:1	18:1d11	18:2	18:3n6	18:3n3	20:0	18:4n3	C20:1d11	20:1d13	C20:2n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	20:5n3	22:3n3	C24:0	C24:1	22:5n3	C22:6n3
1	0,1	4,2	0,1	0,1	0,2	1,8	29,9	2,5	9,9	0,1	38,4	0,5	0,8	1,0	0,0	0,1	2,1	0,3	2,8	0,3	0,1	0,2	0,2	0,5	3,9
2	0,1	4,7	0,1	0,1	0,2	4,0	23,0	2,3	7,4	0,3	29,3	1,0	4,3	1,1	0,0	0,1	1,9	0,4	6,9	1,0	0,0	0,3	0,1	1,7	9,5
3	0,1	3,7	0,2	0,1	0,2	1,8	55,1	1,9	4,7	0,2	15,2	0,8	1,8	1,4	0,0	0,1	0,3	0,5	11,3	0,0	0,0	0,3	0,2	0,0	0,0
4	0,1	4,6	0,2	0,2	0,2	2,9	22,1	1,8	6,6	0,4	26,5	1,0	7,2	1,0	0,0	0,1	0,8	0,5	11,2	1,9	0,0	0,2	0,2	1,7	8,7
5	0,1	4,0	0,1	0,1	0,2	1,7	27,4	2,1	8,1	0,3	26,4	0,6	2,8	1,0	0,0	0,1	1,5	0,3	7,6	1,5	0,0	0,1	0,1	1,8	**12,2**
6	0,1	3,5	0,1	0,1	0,2	1,6	59,8	2,0	4,3	0,1	18,5	0,6	0,5	1,3	0,0	0,0	0,7	0,3	6,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0
7	0,1	6,0	0,3	0,3	0,3	1,7	16,6	2,6	23,9	1,0	23,2	0,6	5,4	0,8	0,0	0,2	0,6	0,4	2,6	1,1	0,0	0,3	0,3	1,7	9,9
8	0,1	4,9	0,1	0,1	0,2	2,7	12,9	1,4	11,7	0,3	34,3	0,9	5,0	0,9	0,0	0,2	2,4	0,5	4,1	1,3	0,0	0,2	0,2	1,8	**13,8**
9	0,1	3,9	0,1	0,1	0,1	2,4	41,6	1,7	21,5	0,0	23,4	0,7	0,0	1,2	0,0	0,1	2,2	0,4	0,0	0,0	0,1	0,3	0,2	0,0	0,0
10	0,1	3,7	0,2	0,1	0,1	2,1	30,9	1,7	19,2	0,4	23,6	0,7	2,1	1,1	0,0	0,1	1,5	0,4	3,6	0,6	0,0	0,2	0,1	0,7	6,9
11	0,1	5,7	0,4	0,3	0,2	3,8	41,2	2,4	26,7	2,1	7,2	1,3	0,3	1,2	0,0	0,2	0,3	0,8	4,8	0,0	0,0	0,6	0,3	0,0	0,0
12	0,1	4,6	0,0	0,1	0,2	2,4	25,5	1,7	16,1	0,3	28,9	0,8	3,9	1,1	0,0	0,1	1,9	0,4	3,9	0,6	0,0	0,2	0,0	1,1	6,2
13	0,1	4,3	0,1	0,1	0,1	4,2	19,4	1,6	9,2	0,1	45,5	1,0	0,2	1,1	0,0	0,1	5,2	0,4	2,6	0,3	0,2	0,2	0,1	0,4	3,4
14	0,1	6,3	0,2	0,2	0,2	4,0	10,5	2,3	8,4	0,3	31,1	1,3	3,9	0,8	0,0	0,1	2,3	0,6	4,6	1,8	0,1	0,3	0,2	2,5	**18,1**
15	0,1	5,1	0,1	0,2	0,2	3,3	16,8	2,4	11,2	0,3	28,8	1,0	4,5	0,9	0,0	0,1	2,1	0,6	3,2	1,5	0,1	0,3	0,1	1,8	**15,1**
16	0,1	4,4	0,1	0,1	0,2	4,0	16,2	1,5	11,6	0,2	33,5	0,9	2,8	1,1	0,0	0,2	3,7	0,4	4,6	0,7	0,1	0,3	0,1	1,3	**12,1**
17	0,2	7,2	0,2	0,2	0,2	4,9	15,0	2,1	8,9	0,3	25,9	1,4	5,1	0,9	0,0	0,0	1,6	0,8	4,9	2,1	0,0	0,6	0,3	2,2	**15,0**
18	0,1	4,0	0,1	0,1	0,2	2,3	64,8	1,2	7,2	0,1	12,5	1,0	3,5	1,5	0,0	0,1	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,5	0,2	0,0	0,0
19	0,1	3,9	0,1	0,1	0,2	4,6	36,9	1,7	7,1	0,2	28,6	1,2	1,8	1,2	0,0	0,1	1,4	0,5	4,3	0,4	0,0	0,4	0,1	0,8	4,3
20	0,1	4,8	0,1	0,1	0,2	6,0	18,5	1,2	12,8	0,2	34,8	1,4	2,4	1,1	0,0	0,1	3,4	0,6	3,2	0,4	0,1	0,3	0,1	0,7	7,6

Quadro 17. Perfis de ácidos gordos de sementes de *C. sativa* transgénicas T1 contendo as construções modB ou modF

	C4:0	C6:0	C6:1	C8:0	C8:1	C18:1d11	C8:2	C18:3n6	C18:3n3	C20:0	18:4n3	C20:1d11	20:1d13	C20:2n6	C20:3n6	C20:4n6	C20:3n3	C22:0	20:4n3	C22:1	20:5n3	C22:2n6	22:3n3	C24:0	C24:1	22:5n3	C22:6n3
123-8	0,1	7,3	0,0	5,2	7,9	1,0	7,7	0,7	29,9	2,3	6,0	7,1	0,4	0,7	0,0	0,0	0,9	0,4	1,3	1,0	4,6	0,0	0,1	0,2	0,3	1,5	**13,3**
123-12	0,1	8,3	0,0	5,3	7,2	1,2	8,7	0,9	27,2	2,5	5,7	6,9	0,5	0,7	0,0	0,1	0,9	0,5	1,5	1,2	5,0	0,0	0,1	0,2	0,4	1,5	**13,2**
5-8	0,1	8,3	0,1	3,5	9,4	1,3	8,1	1,1	29,0	1,0	9,3	7,9	0,4	0,6	0,0	0,0	0,8	0,2	0,4	0,8	3,4	0,0	0,1	0,2	0,4	0,9	**12,6**
5-9	0,1	8,1	0,0	3,5	9,4	1,2	8,4	1,2	29,2	1,0	9,0	8,1	0,3	0,6	0,0	0,0	0,8	0,2	0,5	0,8	3,5	0,0	0,1	0,1	0,3	0,9	**12,6**
17-10	0,1	8,7	0,1	4,1	8,4	1,3	5,5	1,2	26,1	1,6	11,8	7,2	0,3	0,0	0,4	0,0	30,8	0,3	0,4	0,7	5,5	0,0	0,0	0,2	0,3	1,3	**13,5**
17-26	0,1	8,8	0,1	5,5	5,0	1,3	7,6	0,9	27,8	2,7	10,1	6,2	0,3	0,0	0,7	0,0	31,1	0,6	0,5	1,0	4,7	0,1	0,1	0,3	0,4	1,0	**13,1**

Os inventores consideraram que, em geral, a eficiência das atividades de enzima limitante de taxa na via DHA pode ser maior em transformantes de T-ADN com multicópias em comparação com transformantes de T-ADN de cópia única, ou pode ser aumentada inserindo no T-ADN vários genes que codificam a enzima que pode ser um fator limitante na via. Evidência para a possível importância dos transformantes multicópia foi vista nas sementes de *Arabidopsis* transformadas com a construção GA7 (Exemplo 2), onde o evento de DHA de rendimento maior tinha três T-ADNs inseridos no genoma hospedeiro. Os genes múltiplos podem ser idênticos, ou preferentemente são variantes diferentes que codificam o mesmo polipéptido, ou estão sob o controlo dos diferentes promotores que têm padrões de expressão de sobreposição. Por exemplo, a expressão aumentada poderia ser alcançada pela expressão de várias regiões de codificação de Δ6-dessaturase, mesmo onde a mesma proteína é produzida. Em pJP3416-GA7-modF e pJP3416-GA7-modC, por exemplo, duas versões de Δ6-dessaturase de *M. pusilla* estavam presentes e foram expressos pelos promotores

diferentes. As sequências de codificação tinham uso de codões diferentes e, portanto, sequências de nucleótidos diferentes, para reduzir potenciais efeitos de silenciamento ou cossupressão mas resultando na produção da mesma proteína.

Exemplo 6. Atividade de construções específicas para semente em embriões somáticos

A fim de estabelecer um sistema de ensaio rápido que foi preditivo da expressão de construções genéticas em sementes sob o controlo dos promotores de semente específicos, um sistema de embriões somáticos foi criado para *Brassica napus*. Este usou um vetor para expressar o fator de transcrição LEC2 que está envolvido no início da embriogénese somática. Como demonstração, os vetores binários 35S:LEC2 e pJP107 (Petrie *et al.*, 2010a e b foram introduzidos na estirpe AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* através de eletroporação padrão e os transformantes de *Agrobacterium* usados para cotransformar *Brassica napus* pelo cocultivo. A região do T-ADN de pJP107 continha genes que codificam Δ9-elongase de *Isochrysis galbana*, Δ8-dessaturase de *P. salina* e Δ5-dessaturase de *P. salina* com cada gene expresso por um promotor específico de semente. Uma transformação de controlo usou o vetor 35S:LEC2 sozinho. A expressão de 35S:LEC2 resultou na geração de embriões somáticos em cultura de tecidos diretamente a partir do tecido do calo de *B. napus* transformado, conforme descrito no Exemplo 1.

A análise de ácido gordo mostrou que os genes específicos de semente no T-ADN das construções pJP107 foram expressos nos embriões somáticos transgénicos na presença do gene LEC2 cotransformado e funcionaram para produzir ARA ($20:4^{\Delta5,8,11,14}$), a partir de LA e EPA ($20:5^{\Delta5,8,11,14,17}$) a partir de ALA. Os dados para três embriões somáticos cotransformados são mostrados no Quadro 18 e a composição de ácidos gordos de cada um, em

comparação com a composição de ácidos gordos do óleo de semente da semente de *Brassica napus* que foi transgénica para e expressou, o T-ADN de pJP107 (Petrie *et al.*, 2010a e bÉ. Percentagens totais semelhantes de ARA e os ácidos gordos intermediários EDA (20:2ω6É e DGLA (20:3ω6É, bem como as eficiências de conversão, foram observadas no tecido de embriões somáticos quando comparados com os perfis de semente transformados de forma estável. Resultados semelhantes foram observados nas composições de ácidos gordos da semente transgénica T_2 estável e embriões somáticos: os ácidos gordos ω6 encontravam-se a um nível de 26,6 % e 25,6 % (em médiaÉ, respetivamente, enquanto os níveis de ARA foram encontrados como sendo de 9,7 % e 10,6 % (em médiaÉ, respetivamente.

Quando 35S:LEC2 sozinho foi introduzido e os embriões somáticos analisados num curso de tempo, verificou-se que o perfil de ácidos gordos mudava para um perfil mais parecido com embrião com $18:3^{\Delta 9,12,15}$ decrescente e $18:1^{\Delta 9}$ aumentando de forma inversamente correlacionada (Figura 8É. Estes resultados indicaram que os embriões somáticos foram, de fato, se tornando parecidos com a semente no caráter e os genes do T-ADN de pJP107 foram expressos. Isto demonstrou que o sistema de embriões somáticos permitiu uma rápida caracterização das construções específicas de sementes transgénicas em *B. napus* sem exigir que todo o processo de produção de uma planta transgénica e, a partir destas, as sementes maduras.

QuadroÓ18. Composição de ácidos gordos de lípidos obtidos a partir de embriões somáticos de *Brassica napus* gerados pela cotransformação de pJP107 com 35S:LEC2, em comparação com o controlo não transformado (WTÉ e sementes T_2 transformadas com pJP107. As eficiências de conversão enzimática individuais são mostradas entre parênteses após as etapas enzimáticas relevantes. D9-Elo é Δ9-elongase, D8-Des é Δ8-dessaturase e D5-Des é Δ5- dessaturase.

	WT	SementesÓ transgénicasÓT2Ó pJP107Ó	LEC2:ó45	LEC2:ó57	LEC2:Ã58
18:1$^{\Delta 9}$	57,2	45,7	3,8	2,5	1,9
18:2$^{\Delta 9,12}$	19,1	8,7	10	10,6	10
18:3$^{\Delta 9,12,15}$	10,2	4,1	22,5	27,5	24,2
20:2$^{\Delta 11,14}$		7,1 ± 1,9 (6 % D9- eloÉ	5,2 (61,8% D9- eloÉ	3,7 (56,7% D9- eloÉ	4,6 (61,8% D9- eloÉ
20:3$^{\Delta 8,11,14}$		1,1 ± 0,2 (60% D8- desÉ	0,4 (67% D8- desÉ	0,2 (73% D8- desÉ	0,4 (73% D8- desÉ
20:4$^{\Delta 5,8,11,14}$		9,7Ó± 0,9Ó(90% D5- desÉ	10,6Ó(98%ÓD5-des)	10Ó(96%ÓD5-des)	11,2Ó(97%ÓD5-des)
20:3$^{\Delta 11,14,17}$		4,0 ± 0,8	9,9	5,5	7,3
20:4$^{\Delta 8,11,14,17}$		0,3 ± 0,1	0,4	0,3	0,4
20:5$^{\Delta 5,8,11,14,17}$		2,4 ± 0,2	7,6	6,4	7,9
NovosÓtotaisÓ		24,6	34,1	26,1	31,8

Usando o mesmo sistema para gerar embriões somáticos, células de *Brassica napus* foram transformadas separadamente com pJP3416-GA7-modB e pJP3416-GA7-modD. 42 embriões foram obtidos, 18 para modB e 24 para modD. Os lípidos totais foram extraídos dos embriões e analisados para a composição de ácidos gordos. Os embriões continham entre 0 % e até 16,9 % DHA (Quadro 19É. Presumiu-se que os resultados com 0 % DHA são devido à integração de apenas um T-ADN parcial ou uma inserção numa região transcricionalmente silenciosa do genoma. Verificou-se que a razão de ω3 FA total (incluindo ALAÉ para ω6 FA total (incluindo LAÉ era de 2,3 para o embrião Ã270 e 11,96 para o embrião Ã284. A razão de ω6 FA total (incluindo LAÉ para ω3 FA (incluindo ALAÉ foi 0,08 para Ã284. A razão de ω6 FA novo (excluindo LAÉ para ω3 FA novo (excluindo ALAÉ foi 0,03 para Ã284. As

eficiências de conversão gerais foram calculadas como sendo: (para os embriões Ã270, Ã284É OA para EPA = 14,0 %, 29,8 %; OA para DHA = 9,7 %, 24,2 %; LA para EPA = 15,4 %, 30,7 %; LA para DHA = 10,7 %, 25,0 %; ALA para EPA = 22,1 %, 33,3 %; ALA para DHA = 15,3 %, 27,0 %. Estas eficiências foram semelhantes, ou maiores do que no caso de Ã284, para aquelas observadas para as linhagens de *Arabidopsis* pJP3416-GA7 T_3 que indicavam que o vetor pJP3416-GA7-modB foi capaz de funcionar bem em células *B. napus*. O nível de SDA foi abaixo de 3,0 %, indicando que a Δ6-elongase possuía desempenho ainda melhor do que a construção GA7. As eficiências enzimáticas individuais alcançadas em Ã284 foram: Δ12-dessaturase, 97,4 %; ω3-dessaturase, 92,3 %; Δ6-dessaturase, 38,2 %; Δ6-elongase, 88,2 %; Δ5-dessaturase, 98,8 %; Δ5-elongase, 94,1 %; e Δ4-dessaturase, 86,3 %. O total de saturados foi 21,2 %, total de monoinsaturados foi 10,2 %, totais de polinsaturados foi 68,6 %.

Os inventores acreditam que este foi o nível mais alto de DHA alcançado nas células *B. napus* até à data, exceto pelos outros dados descritos abaixo. Isto demonstrou também que a modificação no pJP3416-GA7-modB em relação ao pJP3416-GA7 foi eficaz em aumentar o nível de expressão do gene de Δ6-dessaturase. Os vetores binários pJP3416 GA7, pJP3416-GA7-modA, pJP3416-GA7-modC, pJP3416-GA7-modD, pJP3416 GA7-modE e pJP3416-GA7-modF conforme descritos acima são cotransformados com 35S:LEC2 para gerar os embriões somáticos de *B. napus* transformados. Até 7,0 % de DHA foi observado em embriões modD, 9,9 % em embriões modE, 8,3 % em embriões modF e 3,6 % em um pequeno número de embriões modG.

QuadroÓ19. Composição de ácidos gordos de óleo de embriões somáticos *Brassica napus* Ã270 e Ã284 gerados por cotransformação a construção do ácido DHA específico de semente pJP3416-GA7-modB com 35S:LEC2 e Ã286 e Ã289 (pJP3416-GA7-modDÉ.

	Ã270	Ã284	Ã286	Ã289
14:0	0,3	0,2	0,2	0,2
16:0	14,0	15,7	17,2	16,6
16:1d9	0,7	0,4	0,8	0,8
16:3	0,5	0,6	1,1	1,3
18:0	2,6	2,4	2,5	2,5
18:1d9	6,6	1,8	1,5	1,1
18:1d11	6,3	6,8	6,5	6,7
18:2	18,9	4,5	10,0	9,8
18:3ω 6	0,7	0,8	0,3	0,3
18:3ω 3	33,0	37,2	42,0	41,5
20:0	0,9	0,9	0,8	0,8
18:4ω 3	1,9	2,8	3,6	4,5
20:1d11	0,2	0,1	0,1	0,1
20:2ω 6	0,1	0,1	0,1	0,2
20:3ω 3	0,5	0,0	0,5	0,6
22:0	0,8	1,5	0,6	0,7
20:4ω3	0,2	0,9	0,7	0,7
20:5ω 3	0,7	0,2	0,3	0,3

22:2ω 6	0,0	1,2	0,0	0,0
22:3ω 3	0,0	0,1	0,0	0,1
24:0	0,8	1,0	1,0	1,0
24:1	0,8	1,0	0,7	0,9
22:5ω 3	2,4	2,7	3,2	3,0
22:6ω3	**7,0**	**16,9**	**6,1**	**6,4**

Exemplo 7. Análise de TAG de sementes de *A. thaliana* transgénicas que produzem DHA

A distribuição posicional de DHA no TAG da semente de *A. thaliana* transformada foi determinada por RMN. O lípido total foi extraído a partir de aproximadamente 200 mg de sementes primeiro triturando-as sob hexano antes de transferir a semente triturada para um tubo de vidro contendo 10 ml de hexano. O tubo foi aquecido a cerca de 55 °C num banho de água e, em seguida, agitado e centrifugado. A solução de hexano foi removida e o procedimento repetido com mais 4 x 10 ml. Os extratos foram combinados, concentrados por evaporação rotativa e o TAG no lípido extraído purificado a partir dos lípidos polares pela passagem através de uma coluna de sílica curta usando 20 ml de éter etílico a 7 % em hexano. As distribuições posicionais do grupo acilo no TAG purificado foram determinadas quantitativamente como descrito anteriormente (Petrie *et al.*, 2010a e b).

A análise mostrou que a maioria de DHA no óleo de semente total estava localizada nas posições *sn*-1/3 do TAG com pouco encontrado na posição *sn*-2 (Figura 9). Isto contrastava com TAG de ARA produzindo sementes que demonstraram que 50 % de ARA ($20:4^{\Delta 5,8,11,14}$) foi localizado na posição *sn*-2 do óleo de canola transgénica, enquanto

apenas 33 % seria de esperar numa distribuição aleatória (Petrie *et al.* 2012É.

A distribuição posicional de DHA no TAG das sementes de *B. napus* transformadas com pJP3416-GA7 ou com a combinação de pJP3115 e pJP3116 é determinada essencialmente pelo mesmo método.

O lípido total das sementes transgénicas de *A. thaliana* também foi analisado pelo quadripolo triplo LC-MS para determinar as principais espécies de triacilglicerol contendo DHA (TAGÉ (Figura 10É. As espécies mais abundantes de TAG contendo DHA foram encontradas como sendo DHA-18:3-18:3 (TAG 58: 12; nomenclatura não descritiva da distribuição posicionalÉ com o segundo mais abundante sendo DHA-18:3-18:2 (TAG 58: 11É. Tri-DHA TAG (TAG 66: 18É foi observado em óleo de semente total, embora a níveis baixos, mas detetáveis. Outras espécies de TAG contendo DHA principais incluíam DHA-34:3 (TAG 56:9É, DHA-36:3 (TAG 58:9É, DHA-36:4 (TAG 58:10É, DHA-36:7 (TAG 58:13É e DHA-38:4 (TAG 60:10É. As identidades dos dois principais TAG contendo DHA principais foram ainda confirmadas por Q-TOF MS/MS.

Exemplo 8. Previsão da produção de DHA em sementes de *B. napus*

Produção eficiente de DHA em sementes de *Arabidopsis* a um nível de 15 % usando a construção genética GA7 foi demonstrada no Exemplo 2. A mesma construção em sementes de *Brassica napus* produziram apenas cerca de 1,5 % de DHA em muitos (mas não todosÉ os transformantes, principalmente devido à baixa expressão do gene Δ6-dessaturase de GA7 nesta espécie (Exemplo 4É. Com base na perceção que modificações à construção GA7 iriam superar o problema de expressão do gene de Δ6-dessaturase (veja-se o Exemplo 5, conforme demonstrado no Exemplo 6É, os cálculos foram realizados para determinar o perfil provável de ácido gordo de sementes transgénicas de *B. napus* expressando os genes

de uma variante de pJP3416-GA7, onde cada enzima codificada por transgene teve um desempenho tão eficientemente como foi observado em *A. thaliana* com a construção GA7. As composições de ácidos gordos previstas para três cálculos (#1, #2, #3É são mostradas no Quadro 20. Isto foi baseado numa composição de ácidos gordos de tipo selvagem (não transformadaÉ para *B. napus* que incluiu 59 % de ácido oleico, 20 % de LA e 8 % de ALA. Os três perfis de ácidos gordos parciais previstos mostrados na metade inferior do quadro foram baseados nas eficiências de conversão para cada etapa enzimática mostrada na metade superior do quadro. Na previsão #2, uma combinação de Δ12-dessaturação a 75 % de eficiência, Δ15-dessaturação a 75 %, Δ6-dessaturação a 35 %, Δ6-alongamento a 80 %, Δ5-dessaturação a 90 %, Δ5-alongamento a 90 % e Δ4-dessaturação a 90 % resultaria na produção de aproximadamente 10 % de DHA numa semente de canola transgénica típica. Estas eficiências foram todas menores ou aproximadamente iguais às eficiências individuais vistas em *Arabidopsis*, então a previsão #2 representou uma estimativa conservadora. As eficiências de conversão listadas em #3 foram aproximações baseadas nas conversões eficientes vistas em *A. thaliana* transformada com pJP3416-GA7. Foi previsto que o DHA foi produzido a cerca de 15 % do teor total de ácidos gordos no óleo de semente produzido na semente de *B. napus*, um resultado que espelha os níveis de produção mais eficientes observados em *A. thaliana*. Espera-se que a inserção de vários T-ADNs no estado homozigoto aumente o nível de DHA para 20 % em *B. napus*.

QuadroÓ20. Composição de ácidos gordos prevista para ácidos gordos selecionados como uma percentagem do teor total de ácidos gordos no óleo de semente de *Brassica napus* transformada com uma construção de via de DHA, com base na eficiência enzimática observada em *Arabidopsis* transgénica. As enzimas estão listadas em ordem na via para a produção

de DHA a partir de ácido oleico, des = dessaturase, elo = elongase. As composições de ácido gordo previstas Ã1, Ã2 e Ã3 baseiam-se nas eficiências na metade superior do Quadro.

Enzima		**ó1**	**ó2**	**ó3**
d12-des		70 %	75 %	80 %
d15-des		70 %	75 %	80 %
d6-des (ω3É		30 %	35 %	40 %
d6-elo		80 %	80 %	90 %
d5-des		80 %	90 %	90 %
d5-elo		80 %	90 %	90 %
d4-des		80 %	90 %	90 %
Ácido gordo	**WT**	**ó1**	**ó2**	**ó3**
18:1d9	59 %	26 %	22 %	18 %
18:2ω6	20 %	19 %	17 %	14 %
18:3ω6		1 %	2 %	3 %
18:3ω3	8 %	30 %	32 %	34 %
18:4ω3		3 %	3 %	2 %
20:4ω3		2 %	1 %	2 %
20:5ω3		2 %	1 %	2 %
22:5ω3		1 %	1 %	2 %
22:6ω3		5 %	10 %	15 %

Exemplo 9. Expressão estável de uma via de EPA transgénica em folha de planta

Construção de vetor binário

Um vetor binário, pORE04+11ABGBEC_Cowpea_EPA_insert (SEQ ID NO:8É, foi projetado para introdução de um T-ADN em plantas para a síntese de EPA em tecidos de folha. O mesmo continha genes quiméricos que codificam as enzimas: Δ6-dessaturase de *M. pusilla* (SEQ ID NO: 16É, Δ6-elongase de *P. cordata* (SEQ ID NO:25É e Δ5- dessaturase de *P. salina* (SEQ ID NO:30É, cada uma sobre o controlo dos promotores CaMV 35S e subunidade pequena de rubisco de *A. thaliana*

(SSUÉ (Figura 9É. O vetor binário foi construído pela síntese da região 199-10878 da SEQ ID NO:2 e clonagem desta no vetor binário destinatário pORE04 (Coutu *et al.*, 1997É para os sítios *Bsi*WI e *Kas*I. Os três genes de biossíntese de ácido gordo codificaram para as enzimas necessárias para converter ALA, $18:3^{\Delta 9,12,15}$ em EPA, $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$.

Expressão transiente de construção de EPA em células de folha de *N. benthamiana*

Para testar que a construção estava correta e expressaria os genes eficientemente em tecidos de folha, o vetor quimérico pORE04+HABGBEC_Cowpea_EPA_insert foi introduzido na estirpe AGL1 de *A. tumefaciens*. O vetor quimérico 35S:p19 também foi introduzido na estirpe AGL1 de *A. tumefaciens* conforme descrito no Exemplo 1. As células das culturas destes infiltraram no tecido da folha de plantas de *Nicotiana benthamiana* num quarto de crescimento a 24 °C. Várias comparações diretas foram infiltradas com as amostras a ser comparadas localizadas em ambos os lados da mesma folha. As experiências foram realizadas em triplicado. Após a infiltração, as plantas foram deixadas crescer durante mais cinco dias antes dos discos de folhas serem tomados para análise do perfil de ácidos gordos por GC, conforme descrito no Exemplo 1. A análise de GC revelou que o vetor EPA estava a funcionar para produzir EPA em folhas de *Nicotiana benthamiana* (Quadro 21) com o maior nível de EPA encontrado sendo de 10,7 % de lípidos totais da folha.

Transformação estável de Nicotiana tabacum

O vetor quimérico pORE04+11ABGBEC_Cowpea_EPA_insert foi usado para transformar de forma estável *Nicotiana tabacum*. O vetor foi introduzido na estirpe AGL1 de *A. tumefaciens* através de procedimentos padrão de eletroporação. As células transformadas foram deixadas crescer em meio LB sólido suplementado com canamicina (50 mg/l) e rifampicina (25 mg/l) e incubadas a 28 °C durante

dois dias. Uma colónia única foi usada para iniciar uma cultura nova. Após vigorosa cultura de 48 h, as células foram recolhidas por centrifugação a 2.000x g e o sobrenadante foi removido. As células foram ressuspensas em solução fresca contendo meio 50 % LB e 50 % MS até uma densidade de DO_{600} =0,5.

QuadroÓ21. Composição de ácidos gordos de lípidos de folha totais a partir de *Nicotiana benthamiana* transgénica (transienteÉ e eventos de *Nicotiana tabacum* (transformantes primários estáveisÉ com os níveis de EPA mais elevados a partir de cada experiência.

		N. benthamiana	*N. tabacum*
	14:0	0,1	0,1
	16:0	18,5	17,8
	16:1w13t	2,2	3,8
	16:1d9	0,1	0
	16:3	6,2	5,7
	18:0	3,4	3,2
	18:1d11	0,3	0,3
	20:0	0,5	0,5
	22:0	0,2	0,3
	24:0	0,1	0,4
	18:1	2,9	1,6
	18:2ω6	12,6	14,5
Ómega-6	18:3ω6	2,3	2,9
	20:2ω6	0,0	0,0
	20:3ω6	0,1	0,0
	20:4ω6	0,3	0,7
Ómega-3	18:3ω3	37,1	32,4
	18:4ω3	1,6	1,9
	20:3ω3	0,1	0,3

	20:4ω3	0,3	1,1
	20:5ω3	10,7	12,1
	22:5ω3	0,3	0,4

Amostras de folhas de cultivar W38 de *N. tabacum* cultivadas *in vitro* foram extirpadas e cortadas em secções quadradas com cerca de 0,5-1 cm^2 de tamanho com um bisturi afiado, enquanto imersas na solução de *A. tumefaciens*. Os pedaços da folha de *N. tabacum* ferida submersos em *A. tumefaciens* permaneceram à temperatura ambiente durante 10 minutos antes de serem secos em papel de filtro estéril e transferidos para placas MS, sem suplemento. Após um período de cocultivo de dois dias a 24 °C, os explantes foram lavados três vezes com meio MS líquido estéril, então secos com papel de filtro estéril e colocados no Agar MS seletivo suplementado com benzilaminopurina a 1,0 mg/l (BAP), ácido indoleacético a 0,25 mg/l (IAA), canamicina 50 mg/l e cefotaxima a 250 mg/l. As placas foram incubadas a 24 °C durante duas semanas para permitir o desenvolvimento do broto dos pedaços da folha de *N. tabacum* transformada.

Para estabelecer raízes de plantas transgénicas *in vitro*, brotos verdes saudáveis foram cortados e transferidos em potes de cultura de tecidos de 200 ml contendo meio ágar MS suplementado com IAA a 25 µg/l, canamicina a 50 mg/l e cefotaxima a 250 mg/l. Brotos transgénicos foram transferidos para o solo após o enraizamento e deixados crescer até a maturidade na estufa. Discos de folha suficientemente grandes foram tirados de 21 plantas transgénicas maduras e analisados quanto ao perfil de ácidos gordos conforme descrito no Exemplo 1. Todas as amostras transgénicas demonstraram conter EPA (Quadro 21) com o nível mais elevado de EPA num transformante primário hemizigoto sendo 12,1 % de lípidos totais na folha, as amostras de folha também continham uma pequena quantidade (<0,5 %) de DPA nos seus lípidos, o que resultou no

alongamento de EPA por um baixo nível de atividade de Δ5-alongamento da Δ6-elongase. A razão de ω3 FA total (incluindo ALAÉ para ω6 FA (incluindo LAÉ foi encontrada como sendo 2,7. As eficiências de conversão gerais foram calculadas como sendo: OA para EPA = 18,4 %, LA para EPA = 18,9 %, ALA para EPA = 25,9 %. A produção de 12,1 % EPA é notável, especialmente uma vez que os eventos eram transformantes hemizigotos primários. A eficiência de ALA para EPA em particular é próxima à observada em transformantes de semente estáveis. É interessante notar que a construção não continha uma Δ12 ou Δ15-dessaturase para aumentar a conversão de OA e LA para ALA. A eficiência aumentada seria esperada com adição dessas atividades.

Sementes de hemizigotos transformantes está a ser colhida e semeada para gerar plantas homozigóticas.

A semente definida nas linhagens de EPA superiores pareceu normal e a semente das linhagens #10 e #17 germinou bem para estabelecer a geração T_2. A razão das linhagens EPA para nulas (não EPAÉ indicou que o evento #28 foi de lócus único e a geração T_3 desta linhagem, portanto, foi também estabelecida. A análise do perfil de ácidos gordos da população T_3 indicava que os transgenes foram homozigotos sem eventos nulos encontrados e uma quantidade estável de EPA. Verificou-se que a quantidade média de EPA nos lípidos totais de folha em toda a população T_3 foi de 9,4 %±0,3 (Quadro 22É.

QuadroÓ 22. Perfis de ácidos gordos representativos de lípidos totais de folha de linhagens de tipo selvagem (WTÉ e transgénicas independentes ou transformadas de forma transiente (EPAÉ. As espécies são *Nicotiana benthamiana* (transformação transienteÉ, *N. tabacum* (uma população T_3 transformada de forma estávelÉ, *Vigna unguiculata* (evento T_1 transformado de forma estávelÉ. Os erros denotam o desvio padrão de amostras múltiplas. As eficiências de conversão aparentes mostradas na parte inferior descrevem a

via de ω3 e são calculadas como a soma dos FAs do produto/soma do substrato + FAs do produto.

		N. bethamiana		*N. tabacum*		*V. unguiculata*	
		WTÓ	**EPAÓ**	**WTÓ**	**EPAÓ**	**WTÓ**	**EPAÓ**
	16:0	17,7±0,1	18,7±0,2	15,0±0,6	16,5±0,5	18,0	18,2±0,2
	16:1ω13t	3,2±0,1	2,2±0	3,5±0,1	3,0±0,3	3,8	2,0±0,9
	16:3	6,8±0,1	6,2±0,1	5,2±0,5	5,4±0,3	-	-
	18:0	3,1±0	3,5±0,3	2,2±0,2	2,6±0,1	1,8	4,5±0,4
	Secundários	1,4±0	1,4±0,1	3,1±0,4	2,5±0,3	2,3	2,5±0,4
	OA	1,7±0,1	2,7±0,2	1,6±0,3	2,1±o,3	2,0	4,3±1,3
	LA	12,5±0,4	12,7±0,2	17,0±1,1	18,0±0,9	13,4	18,2±3,0
	ALA	53,3±0,2	37,2±0,2	52,2±1,9	34,0±0,6	58,6	38,2±0
Ómega-6	GLA		2,3±0,1		2,3±0,3		0,6±0,2
Ómega-6	20:2ω6	0,1±0	-	0,1±0	0,1±0	-	0,1±0
Ómega-6	DGLA	0,1±0	0,1±0	-	-	-	-
Ómega-6	ARA	-	0,3±0	-	0,7±0,1	-	0,2±0
Ómega-3	SDA		1,5±0,1		1,6±0,1		1,5±0
Ómega-3	20:3ω3	0,1±0	0,1±0	0,1±0	0,3±0	0,1±0	1,5±0,1
Ómega-3	ETA	-	0,4±0	-	1,1±0,1	-	0,3±0,2
Ómega-3	EPA	-	10,2±0,5	-	9,4±0,3	-	7,1±0,2
Ómega-3	DPA	-	0,3±0,1	-	0,4±0	-	0,8±0,1
Conversão de ómega-3	**Δ6-des**		25 %		27 %		20 %
Conversão de ómega-3	**Δ6-elo**		88 %		87 %		85 %
Conversão de ómega-3	**Δ5-des**		97 %		90 %		96 %
Conversão de ómega-3	**Δ5-elo**		3 %		4 %		10 %

Amostras de folhas de plantas *N. tabacum* T_3 homozigotas foram submetidas a outras análises bioquímicas. Os lípidos totais foram extraídos a partir de material de folha liofilizado e fracionado por cromatografia de camada fina (TLCÉ. Verificou-se que EPA estava presente em TAG de *N. tabacum* até 30,1 % bem como nos lípidos polares a 6,3 %

(Quadro 23É. Foi interessante notar que EPA produzido pela via transgénica estava presente em todas as frações lipídicas avaliadas incluindo TAG, MGDG, DGDG, SQDG, PG, PC, PE, PI e PS. Todos os combinados de lípidos continham baixos níveis de intermediários novos ou ácidos gordos ω6 LC-PUFA com a razão de TAG de novos ácidos gordos ω3 para ω6 sendo 10:1.

Transformação estável do feijão-frade (*cowpea*É

O vetor quimérico pORE04+11ABGBEC-Cowpea-EPA-insert foi transformado em feijão-frade (*Vigna unguiculata*É como se segue. Sementes secas maduras são o material de partida preferencial apesar de as sementes colhidas das vagens imaturas no peso fresco máximo das sementes também poderem ser usadas. Sementes secas são debulhadas à mão para evitar trituramento dos revestimentos da semente e, assim, reduzir a contaminação por microrganismos.

Sementes secas ou vagens imaturas são submersas em etanol a 70 % durante 2 min e em seguida, tratadas durante 30 min em água sanitária comercial a 20 % (concentração final de hipoclorito de sódio 8,4 g/lÉ. As sementes são então lavadas várias vezes com água estéril. As sementes imaturas são removidas asseticamente das vagens, enquanto as sementes maduras são embebidas durante a noite. Dois explantes diferentes podem ser usados para produção de brotos múltiplo, ou seja, o eixo embrionário e o próprio cotilédone, preferentemente o cotilédone com o eixo embrionário bisseccionado anexado. As pontas dos brotos e da raiz são removidas do eixo antes da ferida no nó cotiledonar, ou seja, o ponto de ligação do eixo para o cotilédone. A partir de uma comparação inicial de 19 cultivares e linhagens, é agora evidente que a maioria das linhagens de feijão-frade podem ser transformadas, a única ressalva sendo que diferentes condições de cultura de tecido devem ser otimizadas para cada linhagem.

QuadroÓ23. Análise das frações de lípido da folha jovem e madura (jovem/maduraÉ de triacilglicerol (TAGÉ, lípidos polares totais (PLÉ, monogalactosildiacilglicerol (MGDGÉ, digalactosildiacilglicerol (DGDGÉ, sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDGÉ, fosfatidilglicerol (FGÉ, fosfatidilcolina (PCÉ, fosfatidiletanolamina (PEÉ, fosfatidilinositol (PIÉ e fosfatidilserina (PSÉ de amostras de folha de *Nicotiana tabacum* transgénicas. Os erros denotam o desvio padrão de amostras múltiplas. Até 30 % de EPA foi observado em TAG de folhas com EPA também distribuída através dos lípidos polares. Diferenças entre perfis de folhas jovens e maduras foram observadas também para vários ácidos gordos.

			Cloroplastídico			Extra-cloroplastídico				
	TAG	PL	MGDG	DGDG	SQDG	PG	PC	PE	PI	PS
	16:0	9,8|18,3	17,8|23,8	3,1|3,2	18,0|16,8	48,3|50,0	21,0|26,4	22,9|30,0	24,0|30,5	38,7|43,3	31,9|36,2
	16:1ω13t	0|0	3,4|3,1	0|0	0|0	0|0	34,0|32,0	0|0	0|0	0|0	1,0|1,4
	16:3	0,2|0,9	5,6|6,4	14,8|19,4	1,2|1,8	0,4|1,2	0|0	0|0	0|0	0|0	0|0
	18:0	7,3|3,7	2,9|3,9	1,1|1,2	3,5|3,5	5,4|7,1	4,7|6,9	6,6|9,1	11,0|11,4	9,4|9,3	20,2|19,4
	Secund.	2,5|2,9	1,4|2,4	1,0|0,4	0,8|1,0	1,9|2,1	1,0|1,5	1,4|1,6	4,9|4,1	6,5|7,7	2,5|3,7
	OA	5,5|0,8	2,8|1,1	0,8|0,3	1,8|1,0	2,7|1,3	5,3|4,9	8,1|2,9	2,5|1,1	2,5|0,8	4,9|2,3
	LA	27,7|13,7	17,3|12,3	8,0|6,8	9,2|10,5	11,7|8,9	17,1|13,2	39,2|25,2	37,9|28,5	22,0|13,4	24,4|17,1
	ALA	9,6|17,2	39,0|34,4	60,3|51,9	61,2|58,6	23,7|21,5	15,7|14,1	7,3|18,2	5,5|10,5	7,6|10,0	4,8|10,5
Ómega-6	GLA	2,5|3,0	1,5|2,1	2,1|3,0	1,1|1,8	1,4|1,9	0,2|0	1,8|2,5	1,7|2,7	0,8|0,9	1,1|1,3
	20:2ω6	0|0	0,1|L|	0|0	0|0	0|0	0|0	0|0	0,5 |0	0|0	0|0
	DGLA	0|0	0|0	0|0	0|0	0|0	0|0	0|0	0|0	0|0	0|0
	ARA	0,6|0,9	0,1|0,2	0,2|0,4	0|0	0|0	0|0	0,3|0,3	0,4|0,4	0,4|0,6	0|0,2
Ómega-3	SDA	4,0|7,6	1,6|2,0	1,7|2,0	0,6|0,7	1,2|1,2	0|0	2,1|3,6	1,3|2,0	0,8|0,8	0,9|1,6
	20:3ω3	0,2|0,3	0,1|0,2	0|0	0,2|0,3	0|0	0|0,1	0,2|0	0,3|0,4	0|0	0|0
	ETA	0,9|0,2	0,2|0,3	0|0,2	0|0,3	0|0	0|0	0,2|0	0,4|0,2	0,1|0,2	0|0
	EPA	**28,8|30,1**	**6,1|6,3**	**6,9|11,2**	**2,3|3,6**	**3,4|4,6**	**1,0|0,8**	**9,7|6,4**	**9,1|7,8**	**11,2|12,8**	**8,4|6,2**
	DPA	0,4|0,5	0|0	0|0,1	0|0	0|0	0|0	0,3|0,4	0,5|0,4	0|0,2	0|0,1

Os marcadores de genes selecionáveis, *bar* ou *NptII* podem ser usados para transformação. A estirpe AGL1 de *Agrobacterium tumefaciens* é a estirpe preferencial para transformação de feijão-frade. *Agrobacterium* contendo o vetor pORE04+HABGBEC-Cowpea-EPA-insert é cultivado durante a noite a 28 °C num agitador a 180 rpm e a suspensão é centrifugada a 8000 g durante 10 minutos e ressuspensa em Meio 1 (meio MS básico diluído um em dez e contendo sacarose a 30 g/l, 2-MES a 20 mM, ajustado ao pH 5,6 antes da autoclavagem, suplementado com vitaminas MS esterilizadas por filtração, mioinositol de 100 mg/l, BAP a 1,7 mg/l, GA3 a 0,25 mg/l, acetosiringona a 0,2 mM, Na-tiossulfato a 250 mg/l, ditiotreitol a 150 mg/l e L-cisteína a 0,4 g/lÉ. Os explantes são submersos sem agitar na suspensão bacteriana durante uma hora após ferimento nas regiões meristemáticas com um bisturi. Os explantes tratados são então manchados em papel de filtro estéril e transferidos para Meio 2 solidificado (Meio 1 contendo ágar a 0,8 %É sobreposto com papel de filtro. Após quatro dias de cocultivo, os explantes são transferidos para o Meio 3 (meio MS de força total, suplementado com mioinositol a 100 mg/l, timentina a 150 mg/l, sacarose a 30 g/l, MES a 3 mM, BAP a 1,7 mg/l, PPT a 5 mg/l ou geneticina a 25-50 mg/l ou canamicina a 150 mg/l, ágar a 0,8 g/l e ajustado a pH 5,6É para iniciação de brotos e seleção dos brotos transformados. Depois de duas semanas, os primeiros brotos são visíveis. Os cotilédones são removidos da região do nó cotiledonar e culturas são transferidas para o Meio 3 fresco. Culturas são transferidas para Meio 3 fresco a cada duas semanas após a remoção dos tecidos mortos e a morrer. As quatro primeiras subculturas estão na seleção de canamicina seguida por alternância com geneticina e canamicina. Depois de seis subculturas, os brotos verdes sobreviventes são transferidos para o Meio 4 (Meio 3 sem BAP mas suplementado com GA3 a 0,5 mg/l, asparagina a 50

mg/l, ácido 3-indoleacético (IAAÉ a 0,1 mg/l, timentian a 150 mg/l e PPT (10 mg/lÉ, geneticina (50 mg/lÉ ou canamicina (150 mg/lÉ, para alongamento do broto. Os brotos são subcultivados a cada duas semanas até brotos únicos terem mais de 1 cm de comprimento. Estes brotos maiores são transferidos de placas de Petri para frascos de cultura (80 mm de alturaÉ para crescimento subsequente sob seleção.

A maioria dos brotos regenerados pode ser enraizada *in vitro*, e as plantas enraizadas são transferidas para o solo e é-lhes permitido que se estabeleçam numa câmara de humidade elevada durante 14-21 dias antes da transferência para as condições do ambiente da estufa.

Para aumentar a transferência de genes para o feijão-frade, o meio de cocultura é suplementado com compostos de tiol. A adição de L-cisteína, ditiotreitol, e tiossulfato de sódio reduz o escurecimento do tecido ferido.

Um grande número de explantes de feijão-frade pode ser processado num protocolo simplificado. Resumidamente, o protocolo consiste nas seguintes etapas: embebição das sementes maduras esterilizadas durante a noite em água, explantes são derivados por bissetriz longitudinal da semente como um resultado o eixo embrionário dividido (com ápices do broto e da raiz removidosÉ ainda está anexado ao cotilédone, infeção com a estirpe AGL1 de *Agrobacterium* auxiliado por ferimento local nas regiões meristemáticas, cocultura em meio contendo compostos de tiol durante 4 dias a 25 °C em luz, iniciação e alongamento do broto no meio contendo agentes seletivos, brotos são enraizados *in vitro* e transferidos para condições de estufa para a configuração de floração e sementes, análise PCR ou de enzima de plantas transgénicas putativas e triagem da descendência da geração seguinte por PCR ou atividade enzimática.

Os descendentes das plantas T_0 transgénicas são normais quanto ao fenótipo. Os transgenes são transmitidos para os descendentes e plantas T_2 homozigotas são

identificadas por triagem dos seus descendentes T_3 quanto à atividade enzimática ou por PCR.

Usando este sistema de transformação, cerca de 10 plantas transgénicas são produzidas por 1000 explantes, o que é semelhante à frequência de transformação para outras leguminosas. Dependendo do cultivar ou linhagem a ser transformada, este protocolo requer 5-8 meses desde a preparação do explante para sementes T_1 colhidas.

O sistema de transformação é usado para introduzir o vetor binário pORE04+11 ABGBEC-Cowpea-EPA-insert em plantas de feijão-frade regeneradas e transformadas.

São feitas modificações no vetor binário pORE04+HABGBEC-Cowpea-EPA-insert nas quais genes que codificam uma Δ5-elongase e Δ4-dessaturase são adicionados, para fornecer uma construção genética que confere a capacidade de adicionalmente converter o EPA produzido em DHA. A construção é transformada em plantas para a produção de DHA nos tecidos vegetativos.

EPA demonstrou estar presente no pequeno número de eventos sobrevivendo à seleção química. A linhagem mais alta continha 7,1 %±0,2 de EPA nos lípidos totais de folha. A taxa de transformação foi menor do que normalmente experimentada para o feijão-frade com apenas seis linhagens transgénicas confirmadas. É ainda desconhecido o que causou este efeito, embora seja interessante indicar que uma proporção maior do que a habitual de eventos transgénicos continha regiões de T-ADN incompletas. É possível que o grande tamanho da construção tenha contribuído para a redução da eficiência. As eficiências de conversão aparentes de cada uma das três enzimas transgénicas também foram calculadas (Quadro 22). Os resultados foram muito semelhantes em todas as três espécies com boa conversão para EPA após Δ6-dessaturação inicial do ALA nativo. Algum Δ5-alongamento de EPA para DPA foi observado apesar da ausência de uma Δ5-elongase específica. A Δ6-elongase de *P.*

cordata demonstrou anteriormente ter um baixo nível de atividade de Δ9-elongase (ou seja, conversão de $18:3^{\Delta 9,12,15}$ para $20:3^{\Delta 11,14,17}$É embora nenhuma atividade de Δ5-elongase tenha sido detetada num ensaio de levedura.

ExemploÓ 10.Ó TestagemÓ deÓ variaçõesÓ deÓ genesÓ deÓ Δ12-dessaturaseÓ

Construção de vetor binário

Na tentativa de testar e comparar uma série de genes de Δ12-dessaturase quiméricos, foram preparados diversos vetores binários que foram usados para transformar *A. thaliana* e *B. napus*. Os vetores binários pJP3365, pJP3366, pJP3367, pJP3368 e pJP3369 continham genes que codificaram as enzimas ω3-dessaturase de *P. pastoris* (SEQ ID NO: 12É e Δ6-dessaturase de *M. pusilla* (SEQ ID NO: 16É, e uma de uma série de Δ12-dessaturases. As Δ12-dessaturases foram de *Cryptococcus neoformans* (N.° de acesso XP_570226 em pJP3365É, uma versão de Δ12-dessaturase de *Cryptococcus neoformans* que continha uma mutação L151M na tentativa de aumentar a atividade do gene (em pJP3366É, *Lachancea kluyveri* (SEQ ID NO: 10 em pJP3367É, *Synechocystis* PCC6803 (N.° de acesso BAA18169 em pJP3368É e *Crepis palaestina* (N.° de acesso CAA76157, Lee *et al.*, 1998, em pJP3369É. A dessaturase de *Crepis* foi a única dessaturase de planta na série; as outras eram enzimas fúngicas. Os vetores foram preparados através da inserção de uma região codificadora de proteína otimizada com codões de planta, exceto para a Δ12-dessaturase de *Crepis palestina* que era de tipo selvagem, para cada Δ12-dessaturase no sítio *Not*I do vetor pJP3364 (veja-se a Figura 12É, na orientação operativamente ligada ao promotor FP1 para fornecer expressão específica de semente de cada dessaturase. O vetor pJP3364 já continha os genes quiméricos que codificam ω3-dessaturase de *P. pastoris* e Δ6-dessaturase de *M. pusilla*, cada um sob o controlo dos promotores específicos de semente (Figura 12É. A combinação das três enzimas de biossíntese de ácido

gordo, ou seja, Δ12-dessaturase, ω3-dessaturase e Δ6-dessaturase, foi projetada para montar uma via para converter o ácido oleico (18:1$^{\Delta 9}$É em SDA (18:4$^{\Delta 6,9,12,15}$É. Os ensaios foram realizados, portanto, para medir o nível da produção de SDA em sementes transformadas.

Transformação e análise de A. thaliana e B. napus

Os vetores quiméricos foram introduzidos na estirpe AGL1 de *A. tumefaciens* e células provenientes de culturas de *Agrobacterium* transformado usadas para tratar as plantas *A. thaliana* de mutante fad2 usando o método de imersão floral para transformação (Clough e Bent, 1998É. Após a maturação, as sementes T_1 das plantas tratadas foram colhidas e colocadas em placas MS contendo canamicina para seleção de mudas com o gene marcador selecionável *Npt*II presente no T-ADN de cada vetor quimérico. Mudas T_1 sobreviventes foram transferidas para o solo. Depois de permitir que as plantas se autofertilizassem e crescendo as mesmas até a maturidade, as sementes T_2 dessas plantas foram colhidas e a composição de ácidos gordos de lípidos de sementes analisada por GC.

O vetor quimérico pJP3367 foi também usado para transformar *B. napus* pelo método descrito no Exemplo 4 para gerar 12 eventos transgénicos. SDA foi encontrado no intervalo de 0,6 % a 2,2 % no combinado de sementes das plantas, e nove sementes individuais da planta transgénica com a planta transgénica com SDA mais alto foram analisadas quanto à composição de ácidos gordos. Dados da composição de ácidos gordos desta análise são mostrados no Quadro 24.

Os dados mostraram que a atividade de Δ12-dessaturase expressa de cada um dos T-ADNs em *A. thaliana* e *B. napus* foi inesperadamente baixa, fornecendo uma eficiência de conversão da enzima de cerca de 20 %, em vez de 70-80 % observados com a mesma cassete de expressão na construção GA7 (Exemplos 2 e 3É. A razão para esta expressão relativamente baixa dos genes de Δ12-dessaturase destes

vetores não é clara, mas pode estar relacionada com a posição dos genes na construção como um todo.

Em contraste, a análise da expressão de RT-PCR demonstrou que os genes de ω3- dessaturase de *P. pastoris* e Δ6-dessaturase de *M. pusilla* sobre os T-ADNs foram relativamente bem expressos na semente transformada. O Quadro 24 inclui as eficiências de conversão de Δ6-dessaturase nas sementes transformadas, que variaram de cerca de 11 % a cerca de 25 % na linhagem transformada de *B. napus*. Isto foi consideravelmente maior do que a eficiência de conversão de Δ6-dessaturase de cerca de 7 % vista nas sementes de *B. napus* transformadas com a construção GA7 (Exemplo 4É.

QuadroÓ24. Composição de ácidos gordos como uma percentagem dos ácidos gordos totais no óleo de semente a partir de sementes únicas de uma planta *Brassica napus* T_1 transformada com o T-ADN de pJP3367. SDA (18:4ω3É é mostrado em negrito.

Amostra	CT110-3#1	CT110-3#2	CT110-3#3	CT110-3#4	CT110-3#5	CT110-3#6	CT110-3#7	CT110-3#8	CT110-3#9
C14:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C16:0	4,3	4,2	4,1	4,5	3,8	4,3	4,0	5,0	4,7
16:1d7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
C16:1d9	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3
16:3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
C18:0	1,9	1,9	1,3	1,8	2,1	1,8	2,4	3,1	2,2
C18:1	58,1	59,4	55,5	59,1	62,1	56,0	57,2	52,0	53,2
C18:1d11	3,5	3,6	3,0	3,2	2,9	3,6	3,2	4,4	3,5

C18:2	18,4	17,1	19,2	17,3	17,4	18,7	19,0	20,3	20,2
C18:3ω6	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
C18:3ω3	8,2	9,0	11,1	8,6	7,5	10,2	9,8	9,3	9,8
C20:0	0,5	0,5	0,4	0,5	0,6	0,5	0,6	0,7	0,6
18:4ω3	**2,4**	**2,0**	**2,8**	**2,5**	**1,4**	**2,6**	**1,3**	**2,4**	**3,2**
C20:1d11	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,1	1,2	1,1	1,1
20:1iso	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01	0,03	0,02	0,03	0,02
C20:2ω6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C22:0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2
C24:0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2
C24:1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Δ6-des %	22,9	17,9	20,3	22,8	15,8	20,2	11,7	20,9	24,9

Portanto, para aproveitar as maiores eficiências de conversão de Δ6-dessaturase conferidas pelo T-ADN de pJP3367, as plantas *B. napus* transformadas com este T-ADN foram cruzadas com plantas transformadas com o T-ADN de pJP3416-GA7 (Exemplo 4É para produzir plantas descendentes e sementes carregando os T-ADNs. A composição de ácidos gordos do óleo extraído das sementes F1 é analisada por GC quanto ao teor de DHA e outros teores de ácidos gordos. O aumento dos níveis de DHA é observado em consequência do aumento da expressão de Δ6-dessaturase. São produzidas plantas que são homozigotas para os dois T-ADNs e devem produzir níveis mais elevados de DHA.

Exemplo 11. Acumulação crescente de ácidos gordos e/ou proteínas supressoras de silenciamento

Construção de vetor binário

O documento WO 2010/057246 descreve a utilização de proteínas supressoras de silenciamento (SSPÉ para aumentar a expressão do transgene nas sementes de plantas. Para demonstrar que o uso dessas proteínas poderia melhorar e estabilizar a produção de LC-PUFA em sementes oleaginosas ao longo de várias gerações, vários SSP foram selecionados para o teste, ou seja, V2 (N.° de acesso GU178820.1É, p19 (N.° de acesso AJ288943.1É, p38 (N.° de acesso DQ286869.1É e $P0^{PE}$ (N.° de acesso L04573.1É. p19 é uma proteína supressora do vírus do emanjericado do tomateiro (*Tomato Bushy Stunt Virus* (TBSVÉÉ que se liga aos ARNsi com 21 nucleótidos de comprimento antes de direcionar a clivagem guiada por Argonaute do ARN homólogo (Voinnet *et al.*, 2003É. V2, uma proteína supressora do vírus do frisado amarelo do tomateiro (*Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCVÉÉ, liga-se à proteína da planta SGS3 (Glick *et al.*, 2008É, uma proteína que é necessária para a produção de intermediários de ARN de cadeia dupla a partir dos substratos de ARNss (Beclin *et al.*, 2002É, ou se liga às estruturas de ARNds que possuem uma cadeia secundária 5' (Fukunaga *et al.*, 2009É. P38 é uma proteína supressora do vírus do encrespamento do nabo (*Turnip Crinkle Virus* (TCVÉÉ que interfere com os mecanismos de silenciamento da planta por ligação a proteínas Dicer e Argonaute (Azevedo *et al.*, 2010É. Proteínas P0 como $P0^{PE}$ e RPV-P0, de poleroviruses, direcionam-se para proteínas Argonaute para melhor degradação (Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007, Fusaro *et al.*, 2012É. Construções genéticas foram, portanto, preparadas para expressão destas SSP nas sementes de plantas em combinação com um conjunto de genes de biossíntese de ácidos gordos para produção de ARA ($20:4^{\Delta 5,8,11,14}$É a partir de LA ($18:1^{\Delta 9,12}$É, como se segue.

Os genes da biossíntese de ácidos gordos que codificam a Δ9-elongase de *Isochrysis galbana* e as Δ8 e Δ5-dessaturases de *Pavlova salina* e o marcador de seleção bacteriana foram obtidos num fragmento de ADN único de pJP3010 por digestão com *Pme*I e *AvrII*, dando origem a um fragmento de 9560 pb. A região codificadora de Δ9-elongase neste fragmento foi acompanhada de um promotor de *A. thaliana* FAE1 (pAtFAE1É e uma região de terminação/poliadenilação de transcrição de conlinina (LuCn12-3'É. As regiões codificadoras de dessaturase juntaram-se para um promotor FP1 de napina truncado (pBnFP1É e uma região de terminação/poliadenilação de transcrição nosy. Os três genes de biossíntese de ácidos gordos neste fragmento foram orientados e espaçados da mesma maneira como no pJP107 (Petrie *et al.*, 2012É e codificaram as mesmas proteínas como pJP107. O fragmento de ADN compreendeu também um gene pFP1:GFiP:*nos*3' de pCW141 (ver WO2010/057246É que codificou uma proteína verde fluorescente (GFPÉ. Este gene marcador triável foi usado como um marcador específico visual de sementes, permitindo a identificação simples e não destrutiva e, desse modo, seleção de sementes transgénicas que compreendem e expressam o gene.

O fragmento *Pme*I-*AvrII* foi inserido no sítio *Pme*I-*Avr*II de cada um de uma série de cinco vetores, cada um contendo um gene SSP diferente (WO2010/057246É, resultando nas construções genéticas designadas pFN045, pFN046, pFN047, pFN048 e pFN049. Estas compreende os genes que codificam as SSPs $P0^{PE}$, p38, p19, 35S:V2 e V2, respetivamente. Cada um dos genes SSP estava sob o controlo do promotor FP1 e *ocs*3' região de terminação/poliadenilação da transcrição exceto na construção pFN048 onde a região codificadora V2 estava sob o controlo do promotor CaMV 35S constitutivo. O gene SSP em cada caso estava dentro da região T-ADN das construções, adjacentes à fronteira

direita (RBÉ do T-ADN. Uma sexta construção, pFN050 carecendo de qualquer sequência de codificação SSP, foi preparada por digestão de pFN045 com *Ahd*I e *Nhe*I seguido de recircularização com ADN ligase para deletar o gene FP1:P0. Cada uma das seis construções compreenderam um gene marcador selecionável de *Npt*II dentro do T-ADN e adjacente à fronteira esquerda do T-ADN. Todas as construções tinham uma origem de replicação RK2 para manutenção dos plasmídeos em *Agrobacterium*.

Transformação de *A. thaliana* com vetores de expressão ARA em combinação com SSPs

Para transformar o genótipo MC49 de *Arabidopsis*, que é um mutante duplo *fad1/jae1* com níveis elevados de ácido linoleico nos seus lípidos de sementes, as plantas foram tratadas pelo método de imersão floral (Clough e Bent, 1998É, com a estirpe GV3101 de *A. tumefaciens* transformada separadamente com cada uma das seis construções pFN045-pFN050. As plantas tratadas foram deixadas crescer até à maturidade e sementes T_1 colhidas a partir delas foram colocadas em placas no meio MS contendo canamicina para selecionar plantas T_1 transformadas. A triagem para expressão de GFP na semente também foi usada como um marcador visual para sementes T_1 transformadas. As mudas que sobreviveram nas placas MS/Kan ou que foram obtidas de sementes positivas para GFP foram transferidas para o solo e deixadas crescer até à maturidade para sementes T_2. Os números de plantas transformadas obtidas foram 5, 14, 32, 8, 23 e 24 para as transformações com pFN045, pFN046, pFN047, pFN048, pFN049 e pFN050, respetivamente. Foi descoberto nesta fase que o gene que codifica p38 em pFN046 não era funcional e, portanto, as plantas transformadas com o vetor pFN046 foram consideradas como controlos adicionais, ou seja, essencialmente o mesmo para pFN050.

Cerca de 100 sementes T_2 agrupadas foram tomadas de cada planta transformada para determinação da composição de

ácidos gordos de lípidos de sementes por preparação FAME e análise de GC. Seis mudas T_2 de cada linhagem transgénica também foram deixadas crescer para produzir sementes T_3.

A composição de ácidos gordos nos lípidos totais extraídos de sementes T_2 foi determinada utilizando GC. A análise mostrou um intervalo de níveis de ARA e os intermediários EDA (20:2co6É e DGLA (20:3ω6É nas populações T_2. Os dados para ARA são mostrados nas Figuras 13 e 14.

A Figura 13 mostra uma análise de boxplot do nível de ARA nos lípidos das populações de sementes T_2. Era evidente que o nível mediano (percentil 50É de ARA nas populações de sementes que continham os genes FP1:p19 e 35S:V2, além dos genes de biossíntese de ARA, foi significativamente maior do que em sementes contendo o gene defeituoso FP1:p38 ou o controlo de T-ADN de pFP050 que não continha um gene SSP. Os níveis médios de ARA para sementes transformadas com genes que codificam p19 e V2 foram maiores do que para as sementes transformadas com o gene p38 ou aqueles sem uma SSP (Figura 14É. Uma linhagem FP1:p19 e duas FP1: V2 apresentaram cerca de 19 %, 20 % e 23 % ARA, respetivamente. Estes foram valores atípicos e, portanto, não incluídos nos cálculos para a análise de boxplot. Menos plantas transformadas com os T-ADNs compreendendo os genes FP1:P0^{PE} e 35S:V2 sobreviveram em comparação com as outras construções; acredita-se que esses genes poderiam ser prejudiciais para a saúde da planta no fundo de MC49.

Não só os níveis de ARA foram significativamente diferentes entre as construções, os níveis de lípidos de sementes do primeiro intermediário da via LA para ARA, nomeadamente EDA (20:2ω6É, foram observados como sendo menor em linhagens que expressam V2 ou p19 do que em sementes carecendo de uma SSP ou contendo a construção p38 (Figura 15É. Em sementes T_3, uma população que contém a construção expressando p19 apresentou 38 % ARA como uma percentagem do total de ácidos gordos nos lípidos de

sementes.

Uma gama de linhagens T_3 transgénicas foi avançada para a geração T_4. Os níveis de ARA nas sementes T_4 expressando V2 eram os mesmos em comparação com a geração anterior, ou de facto apresentou níveis aumentados em comparação seus parentes T_3 (Figura 16É. As linhagens expressando p19 mostraram níveis de ARA mais variados. O nível de ARA foi diminuído em algumas linhagens, enquanto em outras foi o mesmo ou aumentado em comparação com os T_3 parentes. Em contraste, as linhagens que contêm o gene defeituoso p38 ou carecendo de SSP geralmente mostraram um declínio no nível de ARA e um aumento nos níveis dos intermediários (Figura 18É. Em algumas destas linhagens, ARA foi reduzido para cerca de 1 % e os níveis de EDA aumentaram para cerca de 20 %. Os níveis médios de ARA em sementes T_4 foram maiores para as linhagens que expressavam p19 e V2 em comparação com linhagens que expressavam p38 ou carecendo de SSP (Figura 17É.

Esta experiência mostrou que a expressão de uma SSP em sementes de uma planta transgénica juntamente com genes adicionais para uma via biossintética de LC-PUFA não só aumentou o nível de produção do ácido gordo desejado na primeira geração de descendentes, mas também estabilizou o nível da produção de ácidos gordos em gerações posteriores, como a terceira ou quarta geração de descendentes. A produção aumentada de ácidos gordos foi acompanhada pela diminuição dos níveis de ácidos gordos intermediários na via biossintética. As SSPs p19 e V2 expressas pelos promotores específicos de sementes foram preferenciais. A construção projetada para expressar a SSP p38 foi defeituosa e nenhum dado útil foi obtido com esta construção. Imagina-se que a SSP V2 e seus homólogos de outros vírus são particularmente preferenciais porque permitem aos mesmos expressão máxima dos genes da via biossintética e o silenciamento simultâneo de outros genes

nas mesmas células na semente em desenvolvimento.

Exemplo 12. Análise do teor de esterol e composição em óleos

Os fitoesteróis de 12 amostras de óleo vegetal compradas a partir de fontes comerciais na Austrália foram caracterizados pela análise de GC e GC-MS como derivados de éter O-trimetilsilílico (éter OTMSi conforme descrito no Exemplo 1. Os esteróis foram identificadas pelos dados de retenção, interpretação de espectros de massa e comparação com dados espectrais de massa padrão do laboratório e literatura. Os esteróis foram quantificados através do uso de um padrão interno de 5β(H-colan-24-ol. A estrutura básica de fitoesterol e as estruturas químicas de alguns dos esteróis identificados são mostradas na Figura 19 e Quadro 25.

Os óleos vegetais analisados foram de: gergelim (*Sesamum indicum*, azeitona (Olea europaea, girassol (*Helianthus annus*, rícino (*Ricinus communis*, canola (*Brassica napus*, cártamo (*Carthamus tinctorius*, amendoim (*Arachis hypogaea*, linho (*Linum usitatissimum* e soja (*Glycine max*. Na diminuição da abundância relativa, através de todas as amostras de óleo, os fitoesteróis principais foram: B-sitosterol (intervalo de 28-55 % do teor de esterol total, Δ5-avenasterol (isofucosterol (3-24 %, campesterol (2-33 %, Δ5-estigmasterol (0,7-18 %, Δ7-estigmasterol (1-18 % e Δ7-avenasterol (0,1-5 %. Vários outros esteróis secundários foram identificados, estes foram: colesterol, brassicasterol, chalinasterol, campestanol e eburicol. Quatro esteróis C29:2 e dois C30:2 também foram detetados, mas investigação adicional é necessária para a identificação completa destes componentes secundários. Além disso, vários outros esteróis não identificados estavam presentes em alguns dos óleos, mas devido à sua abundância muito baixa, os espectros de massa não foram intensos o suficiente para permitir a

identificação de suas estruturas.

Os teores de esterol expressos em mg/g de óleo em quantidade decrescente foram: óleo de canola (6,8 mg/gÉ, óleo de gergelim (5,8 mg/gÉ, óleo de linho (4.8-5,2 mg/gÉ, óleo de girassol (3,7-4,1 mg/gÉ, óleo de amendoim (3,2 mg/gÉ, óleo de cártamo (3,0 mg/gÉ, óleo de soja (3,0 mg/gÉ, azeite (2,4 mg/gÉ, óleo de rícino (1,9 mg/gÉ. As composições de % de esterol e teor de esterol total são apresentadas no Quadro 26.

QuadroÓ25. Nomes IUPAC/sistemáticos de esteróis identificados.

EsterolÓ N.°	**Nome(s)Ócomum(comuns)**	**NomeÓIUPAC/sistemático**
1	colesterol	colest-5-en-3β-ol
2	brassicasterol	24-metilcolesta-5,22E-dien-3β-ol
3	calinasterol/24-metileno colesterol	24-metilcolesta-5,24(28ÉE-dien-3β-ol
4	campesterol/24-metilcolesterol	24-metilcolest-5-en-3β-ol
5	campestanol/24-metilcolestanol	24-metilcolestan-3β-ol
7	Δ5-estigmasterol	24-etilcolesta-5,22E-dien-3β-ol
9	ergost-7-en-3β-ol	24-metilcolest-7-en-3β-ol
11	eburicol	4,4,14-trimtilergosta-8,24(28É-dien-3β-ol
12	β-sitosterol/24-etilcolesterol	24-etilcolest-5-en-3β-ol
13	D5-avenasterol/ isofucosterol	24-etilcolesta-5,24(28ÉZ-dien-3β-ol
19	D7-stigmasterol/ stigmast-7-en-3b-ol	24-etilcolest-7-en-3β-ol
20	D7-avenasterol	24-etilcolesta7,24(28É-dien-3β-ol

Entre todas as amostras de óleo de semente, o fitoesterol principal foi geralmente β-sitosterol (intervalo de 30-57 % do teor de esterol totalÉ. Havia um grande intervalo entre os óleos nas proporções de outros

esteróis principais: campesterol (2-17 %É, Δ5-estigmasterol (0,7-18 %É, Δ5-avenasterol (4-23 %É, Δ7-estigmasterol (1-18 %É. Óleos de espécies diferentes tinham um perfil de esterol diferente com alguns tendo perfis bastante distintos. No caso do óleo de canola, tinha a maior proporção de campesterol (33,6 %É, enquanto as amostras de outras espécies tinham geralmente níveis mais baixos, por exemplo, até 17 % no óleo de amendoim. O óleo de cártamo teve uma proporção relativamente alta de Δ7-estigmasterol (18 %É, enquanto este esterol foi geralmente baixo nas outras espécies de óleos, até 9 % no óleo de girassol. Devido ao facto de serem distintos para cada espécie, os perfis de esterol podem, portanto, ser usados para ajudar na identificação dos vegetais específicos ou de óleos de plantas e para verificar a sua autenticidade ou adulteração com outros óleos.

Quadro 26. Teor e composição de esterol de óleos de plantas analisados.

Número do esterol	Nome comum do esterol	Sésamo	Azeitona	Girassol	Girassol Prensa a frio	Rícino	Canola	Cártamo	Cártamo Prensa a frio	Amendoim	Linho (linhaça)	Linho (linhaça)	Soja
1	colesterol	0,2	0,8	0,2	0,0	0,1	0,3	0,2	0,1	0,2	0,4	0,4	0,2
2	brassicasterol	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0
3	calinasterol /24-metileno colesterol	1,5	0,1	0,3	0,1	1,1	2,4	0,2	0,1	0,9	1,5	1,4	0,8
4	campesterol /24-metilcolesterol	16,2	2,4	7,4	7,9	8,4	33,6	12,1	8,5	17,4	15,7	14,4	16,9
5	campestanol / 24-metilcolestanol	0,7	0,3	0,3	0,1	0,9	0,2	0,8	0,8	0,3	0,2	0,2	0,7
6	C29:2*	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,5	0,5	0,0	1,2	1,3	0,1
7	Δ5-estigmasterol	6,4	1,2	7,4	7,2	18,6	0,7	7,0	4,6	6,9	5,1	5,8	17,6
8	desconhecido	0,5	1,3	0,7	0,6	0,6	0,7	0,7	1,3	0,4	0,7	0,6	1,3
9	ergost-7-en-3β-ol	0,1	0,1	1,9	1,8	0,2	0,4	2,7	4,0	1,4	1,4	1,4	1,0
10	desconhecido	0,0	1,3	0,9	0,8	1,2	0,9	1,8	0,7	1,2	0,7	0,5	0,7
11	eburicol	1,6	1,8	4,1	4,4	1,5	1,0	1,9	2,9	1,2	3,5	3,3	0,9
12	β-sitosterol / 24-etilcolesterol	55,3	45,6	43,9	43,6	37,7	50,8	40,2	35,1	57,2	29,9	28,4	40,2
13	Δ5-avenasterol /isofucosterol	8,6	16,9	7,2	4,1	19,3	4,4	7,3	6,3	5,3	23,0	24,2	3,3
14	álcool triterpenoide	0,0	2,4	0,9	1,1	0,0	0,0	1,6	1,9	0,0	0,0	0,0	0,9

15	álcool triterpenoide	0,0	0,0	0,7	0,6	0,0	0,0	2,8	1,8	0,0	0,0	0,3	0,0
16	C29:2*	0,0	0,5	0,7	0,7	1,5	1,2	2,8	1,9	2,0	1,0	0,7	0,5
17	C29:2*	1,0	0,9	2,3	2,4	0,6	0,4	1,3	1,9	0,9	1,0	1,0	1,0
18	C30:2*	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19	Δ7-estigmastenol/ estigmast-7-en-3β-ol	2,2	7,1	9,3	10,9	2,3	0,9	10,5	18,3	1,1	7,9	8,7	5,6
20	Δ7-avenasterol	1,3	0,1	3,0	3,6	0,6	0,2	2,0	4,7	0,7	0,4	0,4	0,6
21	desconhecido	0,7	7,1	0,9	0,8	0,0	0,4	0,3	0,4	0,0	3,0	3,6	0,0
22	desconhecido	0,3	0,0	0,3	0,9	0,0	0,0	1,2	1,3	0,2	0,1	0,0	0,3
23	desconhecido	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,5
24	desconhecido	0,0	3,1	0,2	1,3	0,6	0,4	0,2	0,4	0,7	1,7	1,9	0,8
25	desconhecido	0,9	0,4	0,3	0,5	0,3	0,1	0,5	0,7	0,3	0,1	0,1	0,6
26	C31:2	2,4	6,0	4,6	5,7	1,4	0,6	1,0	1,2	1,2	1,2	1,1	5,2
27	desconhecido	0,0	0,4	0,4	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,0	0,3
	Soma	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	Esterol total (mg/g óleo)	5,8	2,4	4,1	3,7	1,9	6,8	3,2	3,0	3,2	4,8	5,2	3,0

C29:2* e C30:2* denotam um esterol C29 com duas ligações duplas e um esterol C30 com duas ligações duplas, respetivamente

Duas amostras de girassol e cártamo foram comparadas, em cada caso uma foi produzida por prensa a frio de sementes e não refinada, enquanto a outra não foi prensada a frio e refinada. Apesar de serem observadas algumas diferenças, as duas fontes de óleos tinham composições semelhantes de esterol e teores de esterol totais, sugerindo que o processamento e refinação tinham pouco efeito sobre estes dois parâmetros. O teor do esterol entre as amostras variou três vezes e variou entre 1,9 mg/g e 6,8 mg/g. O óleo de canola tinha o maior e o óleo de rícino o menor teor de esterol.

Exemplo 13. Acumulação aumentada de DHA na posição de TAG

Os presentes inventores consideraram que a acumulação de DHA na posição *sn*-2 em TAG poderia ser aumentada pela coexpressão de uma 1-acil-glicerol-3-fosfato aciltransferase (LPAATÉ juntamente com a via de biossíntese de DHA como a conferida pela construção GA7 ou as suas variantes. LPAATs preferenciais são aquelas que podem atuar em acil-CoA gordo C22 polinsaturado como substrato, resultando numa maior inserção da cadeia C22 polinsaturada na posição *sn*-2 do LPA para formar PA, em relação à LPAAT endógena. Enzimas LPAAT citoplasmáticas muitas vezes apresentam preferências variadas de substrato, particularmente onde a espécie sintetiza e acumula ácidos gordos incomuns em TAG. Uma LPAAT2 de *Limnanthes douglasii* demonstrou usar erucoil-CoA (C22:1-CoAÉ como substrato para a síntese de PA, em contraste com uma LPAAT1 da mesma espécie que não poderia utilizar o substrato C22 (Brown *et al.*, 2002É.

LPAATs conhecidas foram consideradas e um número foi selecionado para o teste, incluindo algumas que se esperava que aumentassem a incorporação de DHA na posição *sn*-2, como controlos. As LPAATs conhecidas incluem: LPAAT2 de *Arabidopsis thaliana*: (SEQ ID NO: 63, N.° de acesso

ABG48392, Kim *et al.*, 2005É, LPAAT de *Limnanthes alba* (SEQ ID NO: 64, N.° de acesso AAC49185, Lassner *et al.*, 1995É, S1c1p de *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO: 65, N.° de acesso NP_010231, Zou *et al.*, 1997É, LPAAT 1 de *Mortierella alpina* (SEQ ID NO: 67, N.° de acesso AED33305; Patente US 7879591É e LPAATs de *Brassica napus* (SEQ ID NO: 68 e SEQ ID NO:69, N.°s de acesso ADC97479 e ADC97478 respetivamenteÉ. Estas foram escolhidas para cobrir três grupos de enzimas LPAAT: 1É LPAATs de semente de planta de controlo com atividade normalmente baixa em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa incomuns (incluindo LPAATs de *Arabidopsis* e *Brassica*É, 2. LPAATs que anteriormente demonstraram agir sobre os ácidos gordos C22 usando C22 acil-CoA como substrato, neste caso, ácido erúcico C22:1 (incluindo LPAATs de *Limnanthes* e *Saccharomyces*É, 3. LPAATs que os inventores consideraram suscetíveis de utilizar os ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa como EPA e DHA como substratos (incluindo a LPAAT de *Mortierella*É.

A LPAAT2 de *Arabidopsis* (também designada LPAT2É é uma enzima localizada no retículo endoplasmático que demonstra atividade em substratos C16 e C18, porém a atividade em substratos C20 ou C22 não foi testada (Kim *et al.*, 2005É. LPAAT2 de *Limnanthes alba* demonstrou inserir uma cadeia acilo C22:1 na posição *sn*-2 de PA, embora a capacidade de usar o DHA como substrato não tenha sido testada (Lassner *et al.*, 1995É. A LPAAT S1c1p de *S. cerevisiae* selecionada demonstrou ter atividade usando 22:1-CoA, além de 18:1-CoA como substratos, indicando uma ampla especificidade de substrato em relação ao comprimento da cadeia (Zou *et al.*, 1997É. Novamente, DHA-CoA e outros LC-PUFAs não foram testados como substratos. A LPAAT de *Mortierella* demonstrou anteriormente ter atividade em substratos de ácidos gordos EPA e DHA em *Yarrowia lipolytica* transgénica (US 7879591É.

LPAATs adicionais foram identificadas pelos inventores. *Micromonas pusilla* é uma microalga que produz e

acumula DHA no seu óleo, embora a distribuição posicional de DHA em TAG nesta espécie não tenha sido confirmada. A LPAAT de *Micromonas pusilla* (SEQ ID NO: 66, N.° de acesso XP_002501997É foi identificada pela pesquisa da sequência genómica de *Micromonas pusilla* usando a LPAAT2 de *Arabidopsis* como uma sequência de consulta BLAST. Surgiram várias sequências candidatas e a sequência XP_002501997 foi sintetizada para análise como uma provável enzima LPAAT com atividade em C22 LC-PUFA. A LPAAT de *Ricinus communis* foi indicada como uma LPAAT putativa da sequência do genoma de rícino (Chan *et al*, 2010É. Quatro LPAATs candidatas do genoma de rícino foram sintetizadas e testadas em lisados de folha bruta do tecido da folha de *N. benthamiana* infiltrada. As sequências candidatas descritas aqui mostraram atividade de LPAAT.

Um número de LPAATs candidatas estava alinhado com o LPAATs conhecidas numa árvore filogenética (Figura 20É. Observou-se que a LPAAT de *Micromonas* putativa não se agrupou com LPAATs C22 putativas mas foi uma sequência divergente.

Como um teste inicial de várias LPAATs quanto às suas capacidades de usar DHA-CoA como substrato, construções genéticas quiméricas são preparadas para expressão constitutiva de LPAATs exógenas em folhas de *N. benthamiana*, cada uma sob o controlo do promotor 35S, como segue: 35S:Arath-LPAAT2 (LPAAT de *Arabidopsis* ERÉ; 35S:Ricco-LPAAT2; 35S:Limal-LPAAT (LPAAT de *Limnanthes alba*É; 35S:Sacce-S1c1p (LPAAT de *S. cerevisiae*É; 35S:Micpu-LPAAT (LPAAT de *Micromonas pusilla*É; 35S:Moral-LPAAT1 (LPAAT de *Mortierella alpina*É. Uma construção 35S:p19 carecendo de LPAAT exógena é usada como um controlo na experiência. Cada uma destas construções é introduzida através de *Agrobacterium* em folhas de *N. benthamiana* conforme descrito no Exemplo 1, e 5 dias após a infiltração, as zonas de folha tratadas são extirpadas e

moídas para preparar o lisado de folha. Cada lisado inclui LPAAT exógena, bem como as enzimas endógenas para a síntese de LPA. Reações *in vitro* são criadas adicionando separadamente OA, LA ou ALA (substratos C18É, ARA (um substrato C20É e DHA (C22É marcados com ^{14}C para os lisados em triplicado. As reações são incubadas a 25 °C e o nível de incorporação dos ácidos gordos marcados no 14C em PA determinado por TLC. A capacidade de cada LPAAT para utilizar DHA em relação à ARA e os ácidos gordos C18 é calculada. LPAATs de *Limnanthes*, *Mortierella* e *Saccharomyces* demonstraram ter atividade no substrato DHA, com PA radiomarcado aparecendo para estas, mas não para as outras LPAATs. Todas as LPAATs foram confirmadas como ativas por uma alimentação de ácido oleico semelhante.

Para testar a atividade de LPAAT em sementes, várias das sequências codificadoras de proteína ou LPAATs são inseridas num vetor binário sob o controlo de um promotor de conlinina (pLuCn11É. As construções genéticas resultantes contendo os genes quiméricos, Cn11:Arath-LPAAT (controlo negativoÉ, Cn11:Limal-LPAAT, Cn1:Sacce-S1c1p e Cn11:Moral-LPAAT, respetivamente, são usadas em plantas *B. napus* e *A. thaliana* transformadas para gerar transformantes estáveis expressando as LPAATs de forma específica de semente. As plantas transformadas com as construções Cn11:LPAAT são cruzadas com plantas expressando a construção GA7 ou suas variantes (Exemplo 5É que produzem DHA na semente para resultar numa maior incorporação de DHA na posição *sn*-2 do TAG. As construções também são usadas para transformar as plantas *B. napus*, *C. sativa* e *A. thaliana* que já contêm a construção GA7 e variantes das mesmas (Exemplos 2 a 5É para gerar descendentes as construções genéticas parentais e LPAAT. A maior incorporação de DHA na posição sn-2 do TAG é esperada em relação à incorporação em plantas carecendo dos transgenes que codificam LPAAT. O teor de óleo também é melhorado nas

sementes, particularmente para as sementes que produzem níveis mais elevados de DHA, contrariando a tendência vista nas sementes de *Arabidopsis*, conforme descrito no Exemplo 2.

Será apreciado por peritos na especialidade que inúmeras variações e/ou modificações podem ser feitas na invenção como mostrado nas formas de realização específicas sem se afastar do espírito ou do âmbito da invenção como amplamente descrito. As formas de realização presentes devem, portanto, ser consideradas em todos os aspetos como ilustrativas e não restritivas.

O presente pedido reivindica a prioridade do documento US 61/660.392 depositado em 15 de junho de 2012, documento US 61/663.344 depositado em 22 de junho de 2012 e documento US 61/697.676 depositado em 6 de setembro de 2012 e documento US 61/782.680 depositado em 14 de março de 2013.

Qualquer discussão de documentos, atos, materiais, dispositivos, artigos ou semelhantes que foi incluída na presente alimentação é exclusivamente para o propósito de fornecer um contexto para a presente invenção. Não deve ser interpretada como uma admissão de que algum ou todos estes assuntos fazem parte da base da técnica anterior ou são conhecimento geral comum no campo relevante para a presente invenção tal como existia antes da data de prioridade de cada reivindicação deste pedido.

REFERÊNCIASÓ

Abbadi *et al.* (2004É Plant Cell 16: 2734-2748.
Abbott *et al.* (1998É Science 282:2012-2018.
Abdullah *et al.* (1986É Biotech. 4:1087.
Agaba *et al.* (2004É Marine Biotechnol. (NYÉ 6:251-261.
Alvarez *et al.* (2000É Theor Appl Genet 100:319-327.
Armbrust *et al.* (2004É Science 306:79-86.
Attila Kereszt *et al.* (2007É Nature Protocols 2:948 - 952.
Baumberger *et al.* (2007É Curr. Biol. 17:1609-1614.
Baumlein *et al.* (1991É Mol. Gen. Genet. 225:459-467.
Baumlein *et al.* (1992É Plant J. 2:233-239.
Beaudoin *et al.* (2000É Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:6421-6426.
Beclin *et al.* (2002É Curr. Biol. 12:684-688.
Berberich. *et al.* (1998É Plant Mol. Biol. 36:297-306.
Bortolamiol *et al.* (2007É Curr. Biol. 17:1615-1621.
Broun *et al.* (1998É Plant J. 13:201-210.
Brown *et al.* (2002É Biochem J. 364:795-805.
Chapman *et al.* (2004É Gen. Dev. 18:1179-1186.
Chen *et al.* (2004É The Plant Cell 16:1302-1313.
Cheng *et al.* (1996É Plant Cell Rep. 15:653-657.
Cheng *et al.* (2010É Transgenic Res 19: 221-229.
Chikwamba *et al.* (2003É Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:11127-11132.
Cho *et al.* (1999aÉ J. Biol. Chem. 274:471-477.
Cho *et al.* (1999bÉ J. Biol. Chem. 274:37335-37339.
Clough e Bent (1998É Plant J. 16:735-43.
Coutu *et al.* (2007É Transgenic Res. 16: 771-781.
Damude *et al.* (2006É. Proc Natl Acad Sci USA 103: 9446-9451.
Denic e Weissman (2007É Cell 130:663-677.
Domergue et al (2002É Eur. J. Biochem. 269:4105-4113.
Domergue *et al.* (2002É Eur. J. Biochem. 269:4105-4113.
Domergue *et al.* (2003É J. Biol. Chem. 278: 35115-35126.

Domergue *et al.* (2005É Biochem. J. 1389: 483-490.
Dunoyer *et al.* (2004É The Plant Cell 16:1235-1250.
Ellerstrom *et al.* (1996É Plant Mol. Biol. 32:1019-1027.
Fujimura *et al.* (1985É Plant Tissue Culture Lett. 2:74.
Fukunaga (2009É EMBO J. 28:545-55.
Gamez *et al.* (2003É Food Res International 36: 721-727.
Garcia-Maroto *et al.* (2002É Lipids 37:417-426.
Girke *et al.* (1998É Plant J. 15:39-48.
Glick *et al.* (2008É Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 105-157-161.
Grant *et al.* (1995É Plant Cell Rep. 15:254-258.
Hall *et al.* (1991É Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9320-9324 Hamilton and Baulcombe (1999É Science 286:950-952.
Hamilton *et al.* (1997É Gene 200:107-16.
Harayama (1998É. Trends Biotechnol. 16: 76-82.
Hastings *et al.* (2001É Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14304-14309. Hinchee *et al.* (1988É Biotechnology 6:915-922.
Hoffmann *et al.* (2008É J Biol. Chem. 283:22352-22362.
Hong *et al.* (2002aÉ Lipids 37:863-868.
Horiguchi *et al.* (1998É Plant Cell Physiol. 39:540-544.
Horvath *et al.* (2000É Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:1914-1919. Huang *et al.* (1999É Lipids 34:649-659.
Inagaki *et al.* (2002É Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:613-621. Johansen and Carrington (2001É Plant Physiol. 126-930-938.
Kajikawa *et al.* (2004É Plant Mol. Biol. 54:335-52.
Kajikawa *et al.* (2006É FEBS Lett 580:149-154.
Kim *et al.* (2005É Plant Cell. 2005 1073-89.
Knutzon *et al.* (1998É J. Biol Chem. 273:29360-6.
Koziel *et al.* (1996É Plant Mol. Biol. 32:393-405.
Lassner (1995É Plant Physiol. 109:1389-94.
Leonard *et al.* (2000É Biochem. J. 347:719-724.
Leonard *et al.* (2000bÉ Biochem. J. 350:765-770.
Leonard *et al.* (2002É Lipids 37:733-740.

Lewsey *et al.* (2007É Plant J. 50:240-252.
Lo *et al.* (2003É Genome Res. 13:455-466.
Lu and Kang (2008É Plant Cell Rep. 27:273-8.
Mallory *et al.* (2002É Nat. Biotech. 20:622-625.
Marangoni *et al.* (1995É Trends in Food Sci. Technol. 6: 329-335. Meesapyodsuk *et al.* (2007É J Biol Chem 282: 20191-20199.
Meng *et al.* (2008É J. Gen. Virol. 89:2349-2358.
Meyer *et al.* (2003É Biochem. 42:9779-9788.
Meyer *et al.* (2004É Lipid Res 45:1899-1909.
Michaelson *et al.* (1998aÉ J. Biol. Chem. 273:19055-19059.
Michaelson *et al.* (1998bÉ FEBS Lett. 439:215-218.
Murashige e Skoog (1962É Physiologia Plantarum 15:473-497. Napier *et al.* (1998É Biochem. J. 330:611-614.
Needleman e Wunsch (1970É J. Mol. Biol. 48:443-453.
Niedz *et al.* (1995É Plant Cell Reports 14:403.
Ow *et al.* (1986É Science 234:856-859.
Parker-Barnes *et al.* (2000É Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:8284-8289. Pereira *et al.* (2004aÉ Biochem. J. 378:665-671.
Pereira *et al.* (2004bÉ Biochem. J. 384:357-366.
Perrin *et al.* (2000É Mol Breed 6:345-352.
Petrie *et al.* (2010aÉ Metab. Eng. 12:233-240.
Petrie *et al.* (2010bÉ Plant Methods 11:6:8.
Petrie *et al.* (2012É Transgenic Res. 21:139-147.
Potenza *et al.* (2004É In Vitro Cell Dev Biol - Plant 40:1-22.
Prasher et al (1985É Biochem. Biophys. Res. Commun. 127:31-36.
Qi *et al.* (2002É FEBS Lett. 510:159-165.
Qi *et al.* (2004É Nat. Biotech. 22: 739-745.
Qiu *et al.* (2001É J. Biol. Chem. 276:31561-31566.
Reddy e Thomas (1996É Nat. Biotech. 14:639-642.
Reddy *et al.* (1993É Plant Mol. Biol. 22:293-300.
Robert *et al.* (2005É Func. Plant Biol. 32:473-479.

Robert *et al.* (2009É Marine Biotech 11:410-418.
Ruiz-Lopez *et al.* (2012É Transgenic Res. 21:139-147.
Saha *et al.* (2006É Plant Physiol. 141:1533-1543.
Saito *et al.* (2000É Eur. J. Biochem. 267:1813-1818.
Sakuradani *et al.* (1999É Gene 238:445-453.
Sato *et al.* (2004É Crop Sci. 44: 646-652.
Sakuradani *et al.* (2005É Appl. Microbiol. Biotechnol. 66:648-654. Sayanova *et al.* (2006É J Biol Chem 281: 36533-36541.
Sayanova *et al.* (1997É Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:4211-4216. Sayanova *et al.* (2003É FEBS Lett. 542:100-104.
Sayanova *et al.* (2006É Planta 224:1269-1277.
Sayanova *et al.* (2007É Plant Physiol 144:455-467.
Singh *et al.* (2005É Curr. Opin. in Plant Biol. 8:197-203.
Speranza *et al.* (2012É Process Biochemistry (In PressÉ.
Sperling *et al.* (2000É Eur. J. Biochem. 267:3801-3811.
Sperling *et al.* (2001É Arch. Biochm. Biophys. 388:293-8.
Sprecher *et al.* (1995É J. Lipid Res. 36:2471-2477.
Spychalla *et al.* (1997É Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:1142-1147. Stalker *et al.* (1998É J. Biol. Chem. 263:6310-6314.
Thillet *et al.* (1988É J. Biol. Chem 263:12500-12508.
Tonon *et al.* (2003É FEBS Lett. 553:440-444.
Toriyama *et al.* (1986É Theor. Appl. Genet. 205:34.
Trautwein (2001É European J. Lipid Sci. and Tech. 103:45-55. Tvrdik (2000É J. Cell Biol. 149:707-718.
Venegas-Caleron *et al.* (2010É Prog. Lipid Res. 49:108-119. Voinnet *et al.* (2003É Plant J. 33:949-956.
Wallis e Browse (1999É Arch. Biochem. Biophys. 365:307-316. Watts e Browse (1999bÉ Arch. Biochem. Biophys. 362:175-182. Weiss *et al.* (2003É Int. J. Med. Microbiol. 293:95:106.
Whitney *et al.* (2003É Planta 217:983-992.
Winans (1988É J. Bacteriol. 170:4047-54.

Wood (2009É Plant Biotechnol J. 7:914-24.
Wu *et al.* (2005É Nat. Biotech. 23:1013-1017.
Yang *et al.* (2003É Planta 216:597-603.
Zank *et al.* (2002É Plant J. 31:255-268.
Zank *et al.* (2005É WO 2005/012316 Zhang *et al.* (2004É FEBS Lett. 556:81-85.
Zhang *et al.* (2006É 20:3255-3268.
Zhang *et al.* (2007aÉ FEBS Letters 581: 315-319.
Zhang *et al.* (2008É Yeast 25: 21-27.
Zhou *et al.* (2007É Phytochem. 68:785-796.
Zhou *et al.* (2008É Insect Mol Biol 17: 667-676.
Zou *et al.* (1997É Plant Cell. 9:909-23.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Nuseed Pty Ltd
Grain Research and Development Corporation
Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation

<120> PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS POLINSATURADOS DE CADEIA LONGA EM CÉLULAS VEGETAIS

<130> B11119-CA

<140> EP 13803782.5
<141> 14-06-2013

<150> US 61/660.392
<151> 15-05-2012

<150> US 61/663.344
<151> 22-06-2012

<150> US 61/697.676
<151> 06-09-2012

<150> US 61/782.680
<151> 14-03-2013

<160> 72

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1
<211> 21527
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência de nucleótidos de pJP3416-GA7.

<400> 1

tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttca cgccctttta 60
aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120
tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180
tcacgacgtt gtaaaacggg cgccccgcgg aaagcttgcg gccgcccgat ctagtaacat 240
agatgacacc gcgcgcgata atttatccta gtttgcgcgc tatattttgt tttctatcgc 300
gtattaaatg tataattgcg ggactctaat cataaaaacc catctcataa ataacgtcat 360
gcattacatg ttaattatta cgtgcttaac gtaattcaac agaaattata tgataatcat 420
cgcaagaccg gcaacaggat tcaatcttaa gaaactttat tgccaaatgt ttgaacgatc 480
ggcgcgcctc attagtgagc cttctcagcc tttccgttaa cgtagtagtg ctgtcccacc 540
ttatcaaggt tagagaaagt agccttccaa gcaccgtagt aagagagcac cttgtagttg 600
agtccccact tcttagcgaa aggaacgaat cttctgctaa cctcaggctg tctgaattga 660
ggcatatcag ggaagaggtg gtggataacc tgacagttaa ggtatcccat aagccagttc 720

acgtatcctc tagaaggatc gatatcaacg gtgtgatcaa cagcgtagtt aacccaagaa 780

aggtgcttat cagatggaac aacagggagg tgagtatgag aagtagagaa gtgagcgaaa 840

aggtacatgt aagcgatcca gtttccgaaa gtgaaccacc agtaagcaac aggccaagag 900

tatccagtag caagcttgat aacagcggtt ctaacaacat gagaaacgag catccaagaa 960

gcctcttcgt agttcttctt acggagaact tgtctagggt ggagaacgta gatccagaaa 1020

gcttgaacaa gaagtccaga ggtaacagga acgaaagtcc aagcttgaag tctagcccaa 1080

gctctagaga atcctctagg tctgttatcc tcaacagcag tgttgaagaa agccacagca 1140

ggagtggtat caagatccat atcgtgtcta acctttgag gggtagcatg gtgcttgtta 1200

tgcatctggt tccacatctc accagaagta gaaagtccga atccacaagt catagcctga 1260

agtctcttgt ccacgtaaac agatccggta agagagttat gtccaccctc atgttgaacc 1320

catccacatc tagctccgaa gaaagcaccg taaacaacag aagcaatgat agggtatcca 1380

gcgtacataa gagcagttcc aagagcgaat gtagcaagaa gctcgagaag tctgtaagcc 1440

acatgggtga tagaaggctt gaagaatcca tctctctcaa gctcagcacg ccatctagcg 1500

aaatcctcaa gcataggagc atcctcagac tcagatctct tgatctcagc aggtctagaa 1560

ggcaaagctc taagcatctt ccaagccttg agagaacgca tgtggaattc tttgaaagcc 1620

tcagtagcat cagcaccagt gttagcaagc atgtagaaga tcacagatcc accagggtgc 1680

ttgaagttag tcacatcgta ctcaacgtcc tcaactctaa cccatctagt ctcgaaagta 1740

gcagcaagct catgaggctc aagagtctta agatcaacag gagcagtaga agcatcctta 1800

gcatcaagag cctcagcaga agatttagac ctggtaagtg gagatctagg agaagatctt 1860

ccatcagtct taggagggca catggtatgg taattgtaaa tgtaattgta atgttgtttg 1920

ttgtttgttg ttgttggtaa ttgttgtaaa agatcctcgt gtatgttttt aatcttgttt 1980

gtatcgatga gttttggttt gagtaaagag tgaagcggat gagttaattt ataggctata 2040

aaggagattt gcatggcgat cacgtgtaat aatgcatgca cgcatgtgat tgtatgtgtg 2100

tgctgtgaga gagaagctct taggtgtttg aagggagtga caagtggcga agaaaaacaa 2160

ttctccgcgg ctgcatgcta tgtgtaacgt gtagctaatg ttctggcatg gcatcttatg 2220

aacgattctt tttaaaaaca aggtaaaaac ttaacttcat aaaattaaaa aaaaaaacgt 2280

ttactaagtt ggtttaaaag gggatgagac tagtagattg gttggttggt ttccatgtac 2340

cagaaggctt accctattag ttgaaagttg aaactttgtt ccctactcaa ttcctagttg 2400

tgtaaatgta tgtatatgta atgtgtataa aacgtagtac ttaaatgact aggagtggtt 2460

cttgagaccg atgagagatg ggagcagaac taaagatgat gacataatta agaacgaatt 2520

tgaaaggctc ttaggtttga atcctattcg agaatgtttt tgtcaaagat agtggcgatt 2580

ttgaaccaaa gaaaacattt aaaaaatcag tatccggtta cgttcatgca aatagaaagt 2640

ggtctaggat ctgattgtaa ttttagactt aaagagtctc ttaagattca atcctggctg 2700

tgtacaaaac tacaaataat atattttaga ctatttggcc ttaactaaac ttccactcat 2760

tatttactga ggttagagaa tagacttgcg aataaacaca ttcccgagaa atactcatga 2820

tcccataatt agtcagaggg tatgccaatc agatctaaga acacacattc cctcaaattt 2880

taatgcacat gtaatcatag tttagcacaa ttcaaaaata atgtagtatt aaagacagaa 2940

atttgtagac ttttttttgg cgttaaaaga agactaagtt tatacgtaca ttttatttta 3000

agtggaaaac cgaaattttc catcgaaata tatgaattta gtatatatat ttctgcaatg 3060

tactattttg ctattttggc aactttcagt ggactactac tttattacaa tgtgtatgga 3120

tgcatgagtt tgagtataca catgtctaaa tgcatgcttt gtaaaacgta acggaccaca 3180

aaagaggatc catacaaata catctcatag cttcctccat tattttccga cacaaacaga 3240

gcattttaca acaattacca acaacaacaa acaacaaaca acattacaat tacatttaca 3300

attaccatac catggaattc gcccagcctc ttgttgctat ggctcaagag caatacgctg 3360

ctatcgatgc tgttgttgct cctgctatct tctctgctac tgattctatc ggatggggac 3420

ttaagcctat ctcttctgct actaaggact tgcctcttgt tgagtctcct acacctctca 3480

tcctttcttt gcttgcttac ttcgctatcg ttggatctgg actcgtttac agaaaggttt 3540

tccctagaac cgtgaaggga caagatccat tccttttgaa ggctcttatg cttgctcaca 3600

acgtgttcct tatcggactt tctctttaca tgtgcctcaa gcttgtgtac gaggcttacg 3660

ttaacaagta ctctttctgg ggaaacgctt acaaccctgc tcaaactgag atggctaagg 3720

ttatctggat cttctacgtg agcaagatct acgagttcat ggataccttc atcatgctcc 3780

tcaagggaaa tgttaaccag gttagcttcc ttcacgttta ccatcacgga tctatctatg 3840

gaatctggtg gatgattact tacgctgctc ctggtggtga tgcttacttc tctgctgctc 3900

ttaactcttg ggttcacgtg tgtatgtaca cctactattt tatggctgcc gtgcttccta 3960

aggacgagaa aactaagaga aagtacctct ggtggggaag ataccttact caaatgcaga 4020

tgttccagtt cttcatgaac cttctccagg ctgtttacct tctctactct tcatctcctt 4080

accctaagtt tatcgctcag ctcctcgtgg tgtacatggt tactcttctc atgcttttcg 4140

gaaacttcta ctacatgaag caccacgcta gcaagtgatg aggcgcgccg ggccgccgcc 4200

atgtgacaga tcgaaggaag aaagtgtaat aagacgactc tcactactcg atcgctagtg 4260

attgtcattg ttatatataa taatgttatc tttcacaact tatcgtaatg catgtgaaac 4320

tataacacat taatcctact tgtcatatga taacactctc cccatttaaa actcttgtca 4380

atttaaagat ataagattct ttaaatgatt aaaaaaaata tattataaat tcaatcactc 4440

ctactaataa attattaatt attatttatt gattaaaaaa atacttatac taatttagtc 4500

tgaatagaat aattagattc tagtctcatc ccctttaaa ccaacttagt aaacgttttt 4560

ttttttaatt ttatgaagtt aagtttttac cttgttttta aaaagaatcg ttcataagat 4620

gccatgccag aacattagct acacgttaca catagcatgc agccgcggag aattgttttt 4680

cttcgccact tgtcactccc ttcaaacacc taagagcttc tctctcacag cacacacata 4740

caatcacatg cgtgcatgca ttattacacg tgatcgccat gcaaatctcc tttatagcct 4800

ataaattaac tcatccgctt cactctttac tcaaaccaaa actcatcgat acaaacaaga 4860

ttaaaaacat acacgaggat cttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac 4920

attacaatta catttacaat taccatacca tgcctccaag ggactcttac tcttatgctg 4980

ctcctccttc tgctcaactt cacgaagttg atactcctca agagcacgac aagaaagagc 5040

ttgttatcgg agatagggct tacgatgtta ccaacttcgt taagagacac cctggtggaa 5100

agatcattgc ttaccaagtt ggaactgatg ctaccgatgc ttacaagcag ttccatgtta 5160

gatctgctaa ggctgacaag atgcttaagt ctcttccttc tcgtcctgtt cacaagggat 5220

actctccaag aagggctgat cttatcgctg atttccaaga gttcaccaag caacttgagg 5280

ctgagggaat gttcgagcct tctcttcctc atgttgctta cagacttgct gaggttatcg 5340

ctatgcatgt tgctggtgct gctcttatct ggcatggata cactttcgct ggaatcgcta 5400

tgcttggagt tgttcaggga agatgtggat ggcttatgca tgagggtgga cattactctc 5460

tcactggaaa cattgctttc gacagagcta tccaagttgc ttgttacgga cttggatgtg 5520

gaatgtctgg tgcttggtgg cgtaaccagc ataacaagca ccatgctact cctcaaaagc 5580

ttcagcacga tgttgatctt gatacccttc ctctcgttgc tttccatgag agaatcgctg 5640

ctaaggttaa gtctcctgct atgaaggctt ggctttctat gcaagctaag cttttcgctc 5700

ctgttaccac tcttcttgtt gctcttggat ggcagcttta ccttcatcct agacacatgc 5760

tcaggactaa gcactacgat gagcttgcta tgctcggaat cagatacgga cttgttggat 5820

accttgctgc taactacggt gctggatacg ttctcgcttg ttaccttctt tacgttcagc 5880

ttggagctat gtacatcttc tgcaacttcg ctgtttctca tactcacctc cctgttgttg 5940

agcctaacga gcatgctact tgggttgagt acgctgctaa ccacactact aactgttctc 6000

catcttggtg gtgtgattgg tggatgtctt accttaacta ccagatcgag caccaccttt 6060

acccttctat gcctcaattc agacacccta agatcgctcc tagagttaag cagcttttcg 6120

agaagcacgg acttcactac gatgttagag gatacttcga ggctatggct gatactttcg 6180

ctaaccttga taacgttgcc catgctcctg agaagaaaat gcagtaatga gatcgttcaa 6240

acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggtcttgcg atgattatca 6300

tataatttct gttgaattac gttaagcacg taataattaa catgtaatgc atgacgttat 6360

ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac gcgatagaaa 6420
acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct atgttactag 6480
atcggtcgat taaaaatccc aattatattt ggtctaattt agtttggtat tgagtaaaac 6540
aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagtttttat atatatgcct ttaagacttt 6600
ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg actcttctgg catgtaatat 6660
ttcgttaaat atgaagtgct ccatttttat taactttaaa taattggttg tacgatcact 6720
ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttgtt cttccatatt catatgtcaa 6780
aatctatcaa aattcttata tatctttttc gaatttgaag tgaaatttcg ataatttaaa 6840
attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt tttatactta attactaaat 6900
ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc aaacgactaa aataaataaa 6960
tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt taatagatca tatgtttgta 7020
aaaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca aaaatttgac aaagtaagat 7080
taaaataata ttcatctaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg ctgaaaaccc ggcaaaaccg 7140
aaccaatcca aaccgatata gttggtttgg tttgattttg atataaaccg aaccaactcg 7200
gtccatttgc acccctaatc ataatagctt taatatttca agatattatt aagttaacgt 7260
tgtcaatatc ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta tatggctgta atatgaattt 7320
aaaagcagct cgatgtggtg gtaatatgta atttacttga ttctaaaaaa atatcccaag 7380
tattaataat ttctgctagg aagaaggtta gctacgattt acagcaaagc cagaatacaa 7440
agaaccataa agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa caaatatttt taaaaaaata 7500
cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtgata tatttttgt tcttaaacaa gcatcccctc 7560
taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgtta caaaaatttt 7620
ggactactat tgggaacttc ttctgaaaat agtgatagaa cccacacgag catgtgcttt 7680
ccatttaatt ttaaaaacca agaaacatac atacataaca ttccatcagc ctctctctct 7740
ttttattacg gttaatgact taaaacacat cttattatcc catccttaac acctagcagt 7800
gtctttatac gatctcatcg atcaccactt caaaaccatg cagactgctg ctgcccctgg 7860
agctggcatc ggctaggctg ggtgccgcac tgtcccggaa ggtccctagc gacttgttta 7920
gattgatggg accacctctc aacttcctgc tgctgtccct gctgctggat gtcctgcctc 7980
atctggccga ttgcacgctc cagtcccctg catgtgcact cgctcctcaa ttgcttaaga 8040
tcatcgcagc agctatcgaa gtgctggctc tgttgccctc ctccacggcc ttggttgtag 8100
tagtagctgc cgccgccctt ctggactttt tcccacagga accgccgaat aattcgatag 8160
aaccacacga gcatgtgctt tcatttattt taaaaaccaa gaaacataca taacatttca 8220
tcagcctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctcttta 8280

ttacagctgt tacactaact taaaacacat tcatctcatt attattatta ttatccatcc 8340

ttaacacctа gcagtgtctt tgtacgatct cataatcgat caccccttca tcaggtatcc 8400

ttaggcttca ctccaacgtt gttgcagtta cggaacatgt acacaccatc atggttctca 8460

acgaactggc aagatctcca agttttccaa aggctaaccc acatgttctc atcggtgtgt 8520

ctgtagtgct ctcccataac tttcttgatg cactcggtag cttctctagc atggtagaat 8580

gggatccttg aaacgtagtg atggagcaca tgagtctcga tgatgtcatg gaagatgatt 8640

ccgaggattc cgaactctct atcgatagta gcagcagcac ccttagcgaa agtccactct 8700

tgagcatcgt aatgaggcat agaagaatcg gtgtgctgaa ggaaggtaac gaaaacaagc 8760

cagtggttaa caaggatcca aggacagaac catgtgatga aagtaggcca gaatccgaaa 8820

accttgtaag cggtgtaaac agaagtgagg gtagcaagga ttccaagatc agaaagaacg 8880

atgtaccagt agtccttctt atcgaaaaca gggctagaag gccagtagtg agacttgaag 8940

aacttagaaa caccagggta aggttgtcca gtagcgttag tagcaaggta aagagaaagt 9000

cctccaagct gttggaacaa gagagcgaaa acagagtaga taggagtttc ctcagcgata 9060

tcgtgaaggc tggtaacttg gtgcttctct ttgaattcct cggcggtgta aggaacgaaa 9120

accatatctc tggtcatgtg tccagtagcc ttatggtgct tagcatgaga gaacttccag 9180

ctgaagtaag gaaccataac aagagagtgg agaacccatc caacggtatc gttaacccat 9240

ccgtagttag agaaagcaga atgtccacac tcatgtccaa ggatccagat tccgaatccg 9300

aaacaagaga tagagaacac gtaagcagac caagcagcga atctaaggaa ttcgttaggg 9360

agaagaggga tgtaggtaag tccaacgtaa gcgatagcag agatagccac gatatctctc 9420

accacgtaag acatagactt cacgagagat ctctcgtaac agtgcttagg gatagcgtca 9480

aggatatcct tgatggtgta atctggcacc ttgaaaacgt ttccgaaggt atcgatagcg 9540

gtcttttgct gcttgaaaga tgcaacgttt ccagaacgcc taacggtctt agtagatccc 9600

tcaaggatct cagatccaga cacggtaacc ttagacatgg tatggtaatt gtaaatgtaa 9660

ttgtaatgtt gtttgttgtt tgttgttgtt ggtaattgtt gtaaaatttt tggtggtgat 9720

tggttcttta aggtgtgaga gtgagttgtg agttgtgtgg tgggtttggt gagattgggg 9780

atggtgggtt tatatagtgg agactgagga atggggtcgt gagtgttaac tttgcatggg 9840

ctacacgtgg gttcttttgg gcttacacgt agtattattc atgcaaatgc agccaataca 9900

tatacggtat tttaataatg tgtgggaata caatatgccg agtattttac taattttggc 9960

aatgacaagt gtacatttgg attatcttac ttggcctctc ttgctttaat ttggattatt 10020

tttattctct taccttggcc gttcatattc acatccctaa aggcaagaca gaattgaatg 10080

gtggccaaaa attaaaacga tggatatgac ctacatagtg taggatcaat taacgtcgaa 10140

ggaaaatact gattctctca agcatacgga caagggtaaa taacatagtc accagaacat 10200

aataaacaaa aagtgcagaa gcaagactaa aaaaattagc tatggacatt caggttcata 10260

ttggaaacat cattatccta gtcttgtgac catccttcct cctgctctag ttgagaggcc 10320

ttgggactaa cgagaggtca gttgggatag cagatcctta tcctggacta gcctttctgg 10380

tgtttcagag tcttcgtgcc gccgtctaca tctatctcca ttaggtctga agatgactct 10440

tcacaccaac gacgtttaag gtctctatcc tactcctagc ttgcaatacc tggcttgcaa 10500

tacctggagc atcgtgcacg atgattggat actgtggagg aggagtgttt gctgatttag 10560

agctcccggt tgggtgattt gacttcgatt tcagtttagg cttgttgaaa tttttcaggt 10620

tccattgtga agcctttaga gcttgagctt ccttccatgt taatgccttg atcgaatact 10680

cctagagaaa agggaagtcg atctctgagt attgaaatcg aagtgcacat ttttttttcaa 10740

cgtgtccaat caatccacaa acaaagcaga agacaggtaa tctttcatac ttatactgac 10800

aagtaatagt cttaccgtca tgcataataa cgtctcgttc cttcaagagg ggttttccga 10860

catccataac gacccgaagc ctcatgaaag cattagggaa gaacttttgg ttcttcttgt 10920

catggccttt ataggtgtca gccgagctcg ccaattcccg tccgactggc tccgcaaaat 10980

attcgaacgg caagttatgg acttgcaacc ataactccac ggtattgagc aggacctatt 11040

gtgaagactc atctcatgga gcttcagaat gtggttgtca gcaaaccaat gaccgaaatc 11100

catcacatga cggacgtcca gtgggtgagc gaaacgaaac aggaagcgcc tatctttcag 11160

agtcgtgagc tccacaccgg attccggcaa ctacgtgttg ggcaggcttc gccgtattag 11220

agatatgttg aggcagaccc atctgtgcca ctcgtacaat tacgagagtt gttttttttg 11280

tgattttcct agtttctcgt tgatggtgag ctcatattct acatcgtatg gtctctcaac 11340

gtcgtttcct gtcatctgat atcccgtcat ttgcatccac gtgccgccgcc tcccgtgcca 11400

agtccctagg tgtcatgcac gccaaattgg tggtggtgcg ggctgccctg tgcttcttac 11460

cgatgggtgg aggttgagtt tgggggtctc cgcggcgatg gtagtgggtt gacggtttgg 11520

tgtgggttga cggcattgat caatttactt cttgcttcaa attctttggc agaaaacaat 11580

tcattagatt agaactggaa accagagtga tgagacggat taagtcagat tccaacagag 11640

ttacatctct taagaaataa tgtaaccccc ttagacttta tatatttgca attaaaaaaa 11700

taatttaact tttagacttt atatatagtt ttaataacta agtttaacca ctctattatt 11760

tatatcgaaa ctatttgtat gtctcccctc taaataaact tggtattgtg tttacagaac 11820

ctataatcaa ataatcaata ctcaactgaa gtttgtgcag ttaattgaag ggattaacgg 11880

ccaaaatgca ctagtattat caaccgaata gattcacact agatggccat ttccatcaat 11940

atcatcgccg ttcttcttct gtccacatat cccctctgaa acttgagaga cacctgcact 12000

tcattgtcct tattacgtgt tacaaaatga aacccatgca tccatgcaaa ctgaagaatg 12060

gcgcaagaac ccttcccctc catttcttat gtggcgacca tccatttcac catctcccgc 12120
tataaaacac ccccatcact tcacctagaa catcatcact acttgcttat ccatccaaaa 12180
gatacccact tttacaacaa ttaccaacaa caacaaacaa caaacaacat tacaattaca 12240
tttacaatta ccataccatg ccacctagcg ctgctaagca aatgggagct tctactggtg 12300
ttcatgctgg tgttactgac tcttctgctt tcaccagaaa ggatgttgct gatagacctg 12360
atctcaccat cgttggagat tctgtttacg atgctaaggc tttcagatct gagcatcctg 12420
gtggtgctca tttcgtttct ttgttcggag gaagagatgc tactgaggct ttcatggaat 12480
accatagaag ggcttggcct aagtctagaa tgtctagatt ccacgttgga tctcttgctt 12540
ctactgagga acctgttgct gctgatgagg gataccttca actttgtgct aggatcgcta 12600
agatggtgcc ttctgtttct tctggattcg ctcctgcttc ttactgggtt aaggctggac 12660
ttatccttgg atctgctatc gctcttgagg cttacatgct ttacgctgga aagagacttc 12720
tcccttctat cgttcttgga tggcttttcg ctcttatcgg tcttaacatc cagcatgatg 12780
ctaaccatgg tgctttgtct aagtctgctt ctgttaacct tgctcttgga ctttgtcagg 12840
attggatcgg aggatctatg atcctttggc ttcaagagca tgttgttatg caccacctcc 12900
acactaacga tgttgataag gatcctgatc aaaaggctca cggtgctctt agactcaagc 12960
ctactgatgc ttggtcacct atgcattggc ttcagcatct ttacctttg cctggtgaga 13020
ctatgtacgc tttcaagctt ttgttcctcg acatctctga gcttgttatg tggcgttggg 13080
agggtgagcc tatctctaag cttgctggat acctctttat gcctttcttg cttctcaagc 13140
ttaccttctg ggctagattc gttgctttgc ctctttacct tgctccttct gttcatactg 13200
ctgtgtgtat cgctgctact gttatgactg gatctttcta cctcgctttc ttcttcttca 13260
tctcccacaa cttcgagggt gttgcttctg ttggacctga tggatctatc acttctatga 13320
ctagaggtgc tagcttcctt aagagacaag ctgagacttc ttctaacgtt ggaggacctc 13380
ttcttgctac tcttaacggt ggactcaact accaaattga gcatcacttg ttccctagag 13440
ttcaccatgg attctaccct agacttgctc ctcttgttaa ggctgagctt gaggctagag 13500
gaatcgagta caagcactac cctactatct ggtctaacct tgcttctacc ctcagacata 13560
tgtacgctct tggaagaagg cctagatcta aggctgagta atgacaagct tatgtgacgt 13620
gaaataataa cggtaaaata tatgtaataa taataataat aaagccacaa agtgagaatg 13680
aggggaaggg gaaatgtgta atgagccagt agccggtggt gctaattttg tatcgtattg 13740
tcaataaatc atgaattttg tggtttttat gtgttttttt aaatcatgaa ttttaaattt 13800
tataaaataa tctccaatcg gaagaacaac attccatatc catgcatgga tgtttcttta 13860
cccaaatcta gttcttgaga ggatgaagca tcaccgaaca gttctgcaac tatccctcaa 13920

aagctttaaa atgaacaaca aggaacagag caacgttcca aagatcccaa acgaaacata 13980

ttatctatac taatactata ttattaatta ctactgcccg gaatcacaat ccctgaatga 14040

ttcctattaa ctacaagcct tgttggcggc ggagaagtga tcggcgcggc gagaagcagc 14100

ggactcggag acgaggcctt ggaagatctg agtcgaacgg gcagaatcag tattttcctt 14160

cgacgttaat tgatcctaca ctatgtaggt catatccatc gttttaattt ttggccacca 14220

ttcaattctg tcttgccttt agggatgtga atatgaacgg ccaaggtaag agaataaaaa 14280

taatccaaat taaagcaaga gaggccaagt aagataatcc aaatgtacac ttgtcattgc 14340

caaaattagt aaaatactcg gcatattgta ttcccacaca ttattaaaat accgtatatg 14400

tattggctgc atttgcatga ataatactac gtgtaagccc aaaagaaccc acgtgtagcc 14460

catgcaaagt taacactcac gaccccattc ctcagtctcc actatataaa cccaccatcc 14520

ccaatctcac caaacccacc acacaactca caactcactc tcacacctta aagaaccaat 14580

caccaccaaa aattttacaa caattaccaa caacaacaaa caacaaacaa cattacaatt 14640

acatttacaa ttaccatacc atgagcgctg ttaccgttac tggatctgat cctaagaaca 14700

gaggatcttc tagcaacacc gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat accaacggaa 14760

acgtgttctc tgttcctgat ttcaccatca aggacatcct tggagctatc cctcatgagt 14820

gttacgagag aagattggct acctctctct actacgtgtt cagagatatc ttctgcatgc 14880

ttaccaccgg ataccttacc cataagatcc tttaccctct cctcatctct tacacctcta 14940

acagcatcat caagttcact ttctgggccc tttacactta cgttcaagga cttttcggaa 15000

ccggaatctg ggttctcgct catgagtgtg gacatcaagc tttctctgat tacggaatcg 15060

tgaacgattt cgttggatgg acccttcact cttaccttat ggttccttac ttcagctgga 15120

agtactctca tggaaagcac cataaggcta ctggacacat gaccagagat atggttttcg 15180

ttcctgccac caaagaggaa ttcaagaagt ctaggaactt cttcggtaac ctcgctgagt 15240

actctgagga ttctccactt agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa cttggaggat 15300

ggatcgctta cctcttcgtt aacgttacag gacaacctta ccctgatgtt ccttcttgga 15360

aatggaacca cttctggctt acctctccac ttttcgagca aagagatgct ctctacatct 15420

tcctttctga tcttggaatc ctcacccagg gaatcgttct tactctttgg tacaagaaat 15480

tcggaggatg gtccctttтc atcaactggt tcgttcctta catctgggtt aaccactggc 15540

tcgttttcat cacattcctt cagcacactg atcctactat gcctcattac aacgctgagg 15600

aatggacttt cgctaagggt gctgctgcta ctatcgatag aaagttcgga ttcatcggac 15660

ctcacatctt ccatgatatc atcgagactc atgtgcttca ccactactgt tctaggatcc 15720

cattctacaa cgctagacct gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga aagcactaca 15780

ggtctagcga cgagaacatg tggaagtcac tttggaagtc tttcaggtct tgccaatacg 15840

ttgacggtga taacggtgtt ctcatgttcc gtaacatcaa caactgcgga gttggagctg 15900

ctgagaagta atgaaggggt gatcgattat gagatcgtac aaagacactg ctaggtgtta 15960

aggatggata ataataataa taatgagatg aatgtgtttt aagttagtgt aacagctgta 16020

ataaagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagaggctg 16080

atgaaatgtt atgtatgttt cttggttttt aaaataaatg aaagcacatg ctcgtgtggt 16140

tctatcgaat tattcggcgg ttcctgtggg aaaaagtcca gaagggccgc cgcagctact 16200

actacaacca aggccgtgga ggagggcaac agagccagca cttcgatagc tgctgcgatg 16260

atcttaagca attgaggagc gagtgcacat gcaggggact ggagcgtgca atcggccaga 16320

tgagggcagga catccagcag cagggacagc agcaggaagt tgagaggtgg tcccatcaat 16380

ctaaacaagt cgctagggac cttccgggac agtgcggcac ccagcctagc cgatgccagc 16440

tccaggggca gcagcagtct gcatggtttt gaagtggtga tcgatgagat cgtataaaga 16500

cactgctagg tgttaaggat gggataataa gatgtgtttt aagtcattaa ccgtaataaa 16560

aagagagaga ggctgatgga atgttatgta tgtatgtttc ttggttttta aaattaaatg 16620

gaaagcacat gctcgtgtgg gttctatctc gattaaaaat cccaattata tttggtctaa 16680

tttagtttgg tattgagtaa aacaaattcg aaccaaacca aaatataaat atatagtttt 16740

tatatatatg cctttaagac tttttataga attttcttta aaaaatatct agaaatattt 16800

gcgactcttc tggcatgtaa tatttcgtta aatatgaagt gctccatttt tattaacttt 16860

aaataattgg ttgtacgatc actttcttat caagtgttac taaaatgcgt caatctcttt 16920

gttcttccat attcatatgt caaaatctat caaaattctt atatatcttt ttcgaatttg 16980

aagtgaaatt tcgataattt aaaattaaat agaacatatc attatttagg tatcatattg 17040

atttttatac ttaattacta aatttggtta actttgaaag tgtacatcaa cgaaaaatta 17100

gtcaaacgac taaaataaat aaatatcatg tgttattaag aaaattctcc tataagaata 17160

ttttaataga tcatatgttt gtaaaaaaaa ttaatttta ctaacacata tatttactta 17220

tcaaaaattt gacaaagtaa gattaaaata atattcatct aacaaaaaaa aaaccagaaa 17280

atgctgaaaa cccggcaaaa ccgaaccaat ccaaaccgat atagttggtt tggtttgatt 17340

ttgatataaa ccgaaccaac tcggtccatt tgcacccctа atcataatag ctttaatatt 17400

tcaagatatt attaagttaa cgttgtcaat atcctggaaa ttttgcaaaa tgaatcaagc 17460

ctatatggct gtaatatgaa tttaaaagca gctcgatgtg gtggtaatat gtaatttact 17520

tgattctaaa aaaatatccc aagtattaat aatttctgct aggaagaagg ttagctacga 17580

tttacagcaa agccagaata caaagaacca taaagtgatt gaagctcgaa atatacgaag 17640

gaacaaatat ttttaaaaaa atacgcaatg acttggaaca aaagaaagtg atatattttt 17700

tgttcttaaa caagcatccc ctctaaagaa tggcagtttt cctttgcatg taactattat 17760

gctcccttcg ttacaaaaat tttggactac tattgggaac ttcttctgaa aatagtcctg 17820

caggctagta gattggttgg ttggtttcca tgtaccagaa ggcttaccct attagttgaa 17880

agttgaaact ttgttcccta ctcaattcct agttgtgtaa atgtatgtat atgtaatgtg 17940

tataaaacgt agtacttaaa tgactaggag tggttcttga gaccgatgag agatgggagc 18000

agaactaaag atgatgacat aattaagaac gaatttgaaa ggctcttagg tttgaatcct 18060

attcgagaat gtttttgtca aagatagtgg cgattttgaa ccaaagaaaa catttaaaaa 18120

atcagtatcc ggttacgttc atgcaaatag aaagtggtct aggatctgat tgtaatttta 18180

gacttaaaga gtctcttaag attcaatcct ggctgtgtac aaaactacaa ataatatatt 18240

ttagactatt tggccttaac taaacttcca ctcattattt actgaggtta gagaatagac 18300

ttgcgaataa acacattccc gagaaatact catgatccca taattagtca gagggtatgc 18360

caatcagatc taagaacaca cattccctca aattttaatg cacatgtaat catagtttag 18420

cacaattcaa aaataatgta gtattaaaga cagaaatttg tagacttttt tttggcgtta 18480

aaagaagact aagtttatac gtacatttta ttttaagtgg aaaaccgaaa ttttccatcg 18540

aaatatatga atttagtata tatatttctg caatgtacta ttttgctatt ttggcaactt 18600

tcagtggact actactttat tacaatgtgt atggatgcat gagtttgagt atacacatgt 18660

ctaaatgcat gctttgtaaa acgtaacgga ccacaaaaga ggatccatac aaatacatct 18720

catagcttcc tccattattt tccgacacaa acagagcatt ttacaacaat taccaacaac 18780

aacaaacaac aaacaacatt acaattacat ttacaattac cataccatgg cctctatcgc 18840

tatccctgct gctcttgctg gaactcttgg atacgttacc tacaatgtgg ctaaccctga 18900

tatcccagct tctgagaaag ttcctgctta cttcatgcag gttgagtact ggggacctac 18960

tatcggaact attggatacc tcctcttcat ctacttcgga aagcgtatca tgcagaacag 19020

atctcaacct ttcggactca agaacgctat gctcgtttac aacttctacc agaccttctt 19080

caacagctac tgcatctacc ttttcgttac ttctcatagg gctcagggac ttaaggtttg 19140

gggaaacatc cctgatatga ctgctaactc ttggggaatc tctcaggtta tctggcttca 19200

ctacaacaac aagtacgttg agcttctcga caccttcttc atggtgatga ggaagaagtt 19260

cgaccagctt tctttccttc acatctacca ccacactctt ctcatctggt catggttcgt 19320

tgttatgaag cttgagcctg ttggagattg ctacttcgga tcttctgtta acaccttcgt 19380

gcacgtgatc atgtactctt actacggact tgctgctctt ggagttaact gtttctggaa 19440

gaagtacatc acccagatcc agatgcttca gttctgtatc tgtgcttctc actctatcta 19500

caccgcttac gttcagaata ccgctttctg gcttccttac cttcaactct gggttatggt 19560

gaacatgttc gttctcttcg ccaacttcta ccgtaagagg tacaagtcta agggtgctaa 19620

gaagcagtga taagggccgc cgccatgtga cagatcgaag gaagaaagtg taataagacg 19680
actctcacta ctcgatcgct agtgattgtc attgttatat ataataatgt tatctttcac 19740
aacttatcgt aatgcatgtg aaactataac acattaatcc tacttgtcat atgataacac 19800
tctccccatt taaaactctt gtcaatttaa agatataaga ttctttaaat gattaaaaaa 19860
aatatattat aaattcaatc actcctacta ataaattatt aattattatt tattgattaa 19920
aaaaatactt atactaattt agtctgaata gaataattag attctagcct gcagggcggc 19980
cgcggatccc atggagtcaa agattcaaat agaggaccta acagaactcg ccgtaaagac 20040
tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa 20100
catggtggag cacgacacac ttgtctactc caaaaatatc aaagatacag tctcagaaga 20160
ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca 20220
ttgcccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa aaggaaggtg gctcctacaa 20280
atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtggtcc 20340
caaagatgga ccccccaccca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc 20400
ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca 20460
ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaagttca tttcatttgg agagaacacg 20520
ggggactgaa ttaaatatga gccctgagag gcgtcctgtt gaaatcagac ctgctactgc 20580
tgctgatatg gctgctgttt gtgatatcgt gaaccactac atcgagactt ctaccgttaa 20640
cttcagaact gagcctcaaa ctcctcaaga gtggatcgat gatcttgaga gactccaaga 20700
tagataccct tggcttgttg ctgaggttga gggtgttgtt gctggaatcg cttacgctgg 20760
accttggaag gctagaaacg cttacgattg gactgttgag tctaccgttt acgtttcaca 20820
cagacatcag agacttggac ttggatctac cctttacact caccttctca agtctatgga 20880
agctcaggga ttcaagtctg ttgttgctgt tatcggactc cctaacgatc cttctgttag 20940
acttcatgag gctcttggat acactgctag aggaactctt agagctgctg gatacaagca 21000
cggtggatgg catgatgttg gattctggca aagagatttc gagcttcctg ctcctcctag 21060
acctgttaga ccagttactc agatctgaat ttgcgtgatc gttcaaacat ttggcaataa 21120
agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg 21180
aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt 21240
tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc 21300
gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatca ctagtgatgt 21360
acggttaaaa ccaccccagt acattaaaaa cgtccgcaat gtgttattaa gttgtctaag 21420
cgtcaatttg tttacaccac aatatatcct gccaccagcc agccaacagc tccccgaccg 21480

gcagctcggc acaaaatcac cactcgatac aggcagccca tcagtcc 21527

<210> 2

<211> 23512
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência de nucleótidos de pGA7- mod_B

<400> 2

tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttca cgccctttta 60

aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120

tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180

tcacgacgtt gtaaaacggg cgccccgcgg aaagcttgcg gccgcggtac cgcccgttcg 240

actcagatct tccaaggcct cgtctccgag tccgctgctt ctcgccgcgc cgatcacttc 300

tccgccgcca acaaggcttg tagttaatag gaatcattca gggattgtga ttccgggcag 360

tagtaattaa taatatagta ttagtataga taatatgttt cgtttgggat ctttggaacg 420

ttgctctgtt ccttgttgtt cattttaaag cttttgaggg atagttgcag aactgttcgg 480

tgatgcttca tcctctcaag aactagattt gggtaaagaa acatccatgc atggatatgg 540

aatgttgttc ttccgattgg agattatttt ataaaattta aaattcatga tttaaaaaaa 600

cacataaaaa ccacaaaatt catgatttat tgacaatacg atacaaaatt agcaccaccg 660

gctactggct cattacacat ttccccttcc cctcattctc actttgtggc tttattatta 720

ttattattac atatatttta ccgttattat ttcacgtcac ataagcttgt taattaatca 780

ttagtgagcc ttctcagcct ttccgttaac gtagtagtgc tgtcccacct tatcaaggtt 840

agagaaagta gccttccaag caccgtagta agagagcacc ttgtagttga gtccccactt 900

cttagcgaaa ggaacgaatc ttctgctaac ctcaggctgt ctgaattgag gcatatcagg 960

gaagaggtgg tggataacct gacagttaag gtatcccata agccagttca cgtatcctct 1020

agaaggatcg atatcaacgg tgtgatcaac agcgtagtta acccaagaaa ggtgcttatc 1080

agatggaaca acagggaggt gagtatgaga agtagagaag tgagcgaaaa ggtacatgta 1140

agcgatccag tttccgaaag tgaaccacca gtaagcaaca ggccaagagt atccagtagc 1200

aagcttgata acagcggttc taacaacatg agaaacgagc atccaagaag cctcttcgta 1260

gttcttctta cggagaactt gtctagggtg gagaacgtag atccagaaag cttgaacaag 1320

aagtccagag gtaacaggaa cgaaagtcca agcttgaagt ctagcccaag ctctagagaa 1380

tcctctaggt ctgttatcct caacagcagt gttgaagaaa gccacagcag gagtggtatc 1440

aagatccata tcgtgtctaa ccttttgagg ggtagcatgg tgcttgttat gcatctggtt 1500

ccacatctca ccagaagtag aaagtccgaa tccacaagtc atagcctgaa gtctcttgtc 1560

cacgtaaaca gatccggtaa gagagttatg tccaccctca tgttgaaccc atccacatct 1620

agctccgaag aaagcaccgt aaacaacaga agcaatgata gggtatccag cgtacataag 1680

agcagttcca agagcgaatg tagcaagaag ctcgagaagt ctgtaagcca catgggtgat 1740

agaaggcttg aagaatccat ctctctcaag ctcagcacgc catctagcga aatcctcaag 1800

cataggagca tcctcagact cagatctctt gatctcagca ggtctagaag gcaaagctct 1860

aagcatcttc caagccttga gagaacgcat gtggaattct ttgaaagcct cagtagcatc 1920

agcaccagtg ttagcaagca tgtagaagat cacagatcca ccagggtgct tgaagttagt 1980

cacatcgtac tcaacgtcct caactctaac ccatctagtc tcgaaagtag cagcaagctc 2040

atgaggctca agagtcttaa gatcaacagg agcagtagaa gcatccttag catcaagagc 2100

ctcagcagaa gatttagacc tggtaagtgg agatctagga gaagatcttc catcagtctt 2160

aggagggcac atggtatggt aattgtaaat gtaattgtaa tgttgtttgt tgtttgttgt 2220

tgttggtaat tgttgtaaaa ttaattaagt gggtatcttt tggatggata agcaagtagt 2280

gatgatgttc taggtgaagt gatgggggtg ttttatagcg ggagatggtg aaatggatgg 2340

tcgccacata agaaatggag gggaagggtt cttgcgccat tcttcagttt gcatggatgc 2400

atgggtttca ttttgtaaca cgtaataagg acaatgaagt gcaggtgtct ctcaagtttc 2460

agaggggata tgtggacaga agaagaacgg cgatgatatt gatggaaatg gccatctagt 2520

gtgaatctat tcggttgata atactagtgc attttggccg ttaatccctt caattaactg 2580

cacaaacttc agttgagtat tgattatttg attataggtt ctgtaaacac aataccaagt 2640

ttatttagag gggagacata caaatagttt cgatataaat aatagagtgg ttaaacttag 2700

ttattaaaac tatatataaa gtctaaaagt taaattattt ttttaattgc aaatatataa 2760

agtctaaagg ggttacatta tttcttaaga gatgtaactc tgttggaatc tgacttaatc 2820

cgtctcatca ctctggtttc cagttctaat ctaatgaatt gttttctgcc aaagaatttg 2880

aagcaagaag taaattgatc aatgccgtca acccacacca aaccgtcaac ccactaccat 2940

cgccgcggag acccccaaac tcaacctcca cccatcggta agaagcacag ggcagcccgc 3000

accaccacca atttggcgtg catgacacct agggacttgg cacgggaggc ggcgcacgtg 3060

gatgcaaatg acgggatatc agatgacagg aaacgacgtt gagagaccat acgatgtaga 3120

atatgagctc accatcaacg agaaactagg aaaatcacaa aaaaaacaac tctcgtaatt 3180

gtacgagtgg cacagatggg tctgcctcaa catatctcta atacggcgaa gcctgcccaa 3240

cacgtagttg ccggaatccg gtgtggagct cacgactctg aaagataggc gcttcctgtt 3300

tcgtttcgct cacccactgg acgtccgtca tgtgatggat ttcggtcatt ggtttgctga 3360

caaccacatt ctgaagctcc atgagatgag tcttcacaat aggtcctgct caataccgtg 3420

gagttatggt tgcaagtcca taacttgccg ttcgaatatt ttgcggagcc agtcggacgg 3480

gaattggcga gctcggctga cacctataaa ggccatgaca agaagaacca aaagttcttc 3540

cctaatgctt tcatgaggct tcgggtcgtt atggatgtcg gaaaacccct cttgaaggaa 3600

cgagacgtta ttatgcatga cggtaagact attacttgtc agtataagta tgaaagatta 3660

cctgtcttct gctttgtttg tggattgatt ggacacgttg aaaaaaaatg tgcacttcga 3720

tttcaatact cagagatcga cttccctttt ctctaggagt attcgatcaa ggcattaaca 3780

tggaaggaag ctcaagctct aaaggcttca caatggaacc tgaaaaattt caacaagcct 3840

aaactgaaat cgaagtcaaa tcacccaacc gggagctcta aatcagcaaa cactcctcct 3900

ccacagtatc caatcatcgt gcacgatgct ccaggtattg caagccaggt attgcaagct 3960

aggagtagga tagagacctt aaacgtcgtt ggtgtgaaga gtcatcttca gacctaatgg 4020

agatagatgt agacggcggc acgaagactc tgaaacacca gaaaggctag tccaggataa 4080

ggatctgcta tcccaactga cctctcgtta gtcccaaggc ctctcaacta gagcaggagg 4140

aaggatggtc acaagactag gataatgatg tttccaatat gaacctgaat gtccatagct 4200

aatttttta gtcttgcttc tgcacttttt gtttattatg ttctggtgac tatgttattt 4260

acccttgtcc gtatgcttga gggtacccta gtagattggt tggttggttt ccatgtacca 4320

gaaggcttac cctattagtt gaaagttgaa actttgttcc ctactcaatt cctagttgtg 4380

taaatgtatg tatatgtaat gtgtataaaa cgtagtactt aaatgactag gagtggttct 4440

tgagaccgat gagagatggg agcagaacta aagatgatga cataattaag aacgaatttg 4500

aaaggctctt aggtttgaat cctattcgag aatgtttttg tcaaagatag tggcgatttt 4560

gaaccaaaga aaacatttaa aaaatcagta tccggttacg ttcatgcaaa tagaaagtgg 4620

tctaggatct gattgtaatt ttagacttaa agagtctctt aagattcaat cctggctgtg 4680

tacaaaacta caaataatat attttagact atttggcctt aactaaactt ccactcatta 4740

tttactgagg ttagagaata gacttgcgaa taaacacatt cccgagaaat actcatgatc 4800

ccataattag tcagagggta tgccaatcag atctaagaac acacattccc tcaaatttta 4860

atgcacatgt aatcatagtt tagcacaatt caaaaataat gtagtattaa agacagaaat 4920

ttgtagactt ttttttggcg ttaaaagaag actaagttta tacgtacatt ttatttaag 4980

tggaaaaccg aaattttcca tcgaaatata tgaatttagt atatatattt ctgcaatgta 5040

ctattttgct attttggcaa ctttcagtgg actactactt tattacaatg tgtatggatg 5100

catgagtttg agtatacaca tgtctaaatg catgctttgt aaaacgtaac ggaccacaaa 5160

agaggatcca tacaaataca tctcatagct tcctccatta ttttccgaca caaacagagc 5220

attttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac attacaatta catttacaat 5280

taccatacca tggcctctat cgctatccct gctgctcttg ctggaactct tggatacgtt 5340

acctacaatg tggctaaccc tgatatccca gcttctgaga aagttcctgc ttacttcatg 5400
caggttgagt actggggacc tactatcgga actattggat acctcctctt catctacttc 5460
ggaaagcgta tcatgcagaa cagatctcaa cctttcggac tcaagaacgc tatgctcgtt 5520
tacaacttct accagacctt cttcaacagc tactgcatct acctttttcgt tacttctcat 5580
agggctcagg gacttaaggt ttggggaaac atccctgata tgactgctaa ctcttgggga 5640
atctctcagg ttatctggct tcactacaac aacaagtacg ttgagcttct cgacaccttc 5700
ttcatggtga tgaggaagaa gttcgaccag ctttctttcc ttcacatcta ccaccacact 5760
cttctcatct ggtcatggtt cgttgttatg aagcttgagc ctgttggaga ttgctacttc 5820
ggatcttctg ttaacacctt cgtgcacgtg atcatgtact cttactacgg acttgctgct 5880
cttggagtta actgtttctg gaagaagtac atcacccaga tccagatgct tcagttctgt 5940
atctgtgctt ctcactctat ctacaccgct tacgttcaga ataccgcttt ctggcttcct 6000
taccttcaac tctgggttat ggtgaacatg ttcgttctct tcgccaactt ctaccgtaag 6060
aggtacaagt ctaagggtgc taagaagcag tgataaggcg cgcggcgcgc cgggccgccg 6120
ccatgtgaca gatcgaagga agaaagtgta ataagacgac tctcactact cgatcgctag 6180
tgattgtcat tgttatatat aataatgtta tctttcacaa cttatcgtaa tgcatgtgaa 6240
actataacac attaatccta cttgtcatat gataacactc tccccattta aaactcttgt 6300
caatttaaag atataagatt ctttaaatga ttaaaaaaaa tatattataa attcaatcac 6360
tcctactaat aaattattaa ttattattta ttgattaaaa aaatacttat actaatttag 6420
tctgaataga ataattagat tctagtctca tccccttta aaccaactta gtaaacgttt 6480
ttttttttaa ttttatgaag ttaagttttt accttgtttt taaaaagaat cgttcataag 6540
atgccatgcc agaacattag ctacacgtta cacatagcat gcagccgcgg agaattgttt 6600
ttcttcgcca cttgtcactc ccttcaaaca cctaagagct tctctctcac agcacacaca 6660
tacaatcaca tgcgtgcatg cattattaca cgtgatcgcc atgcaaatct cctttatagc 6720
ctataaatta actcatccgc ttcactcttt actcaaacca aaactcatcg atacaaacaa 6780
gattaaaaac atacacgagg atcttttaca acaattacca acaacaacaa acaacaaaca 6840
acattacaat tacatttaca attaccatac catgcctcca agggactctt actcttatgc 6900
tgctcctcct tctgctcaac ttcacgaagt tgatactcct caagagcacg acaagaaaga 6960
gcttgttatc ggagataggg cttacgatgt taccaacttc gttaagagac accctggtgg 7020
aaagatcatt gcttaccaag ttggaactga tgctaccgat gcttacaagc agttccatgt 7080
tagatctgct aaggctgaca agatgcttaa gtctcttcct tctcgtcctg ttcacaaggg 7140
atactctcca agaagggctg atcttatcgc tgatttccaa gagttcacca agcaacttga 7200

ggctgaggga atgttcgagc cttctcttcc tcatgttgct tacagacttg ctgaggttat 7260
cgctatgcat gttgctggtg ctgctcttat ctggcatgga tacactttcg ctggaatcgc 7320
tatgcttgga gttgttcagg gaagatgtgg atggcttatg catgagggtg gacattactc 7380
tctcactgga aacattgctt tcgacagagc tatccaagtt gcttgttacg gacttggatg 7440
tggaatgtct ggtgcttggt ggcgtaacca gcataacaag caccatgcta ctcctcaaaa 7500
gcttcagcac gatgttgatc ttgataccct tcctctcgtt gctttccatg agagaatcgc 7560
tgctaaggtt aagtctcctg ctatgaaggc ttggctttct atgcaagcta agcttttcgc 7620
tcctgttacc actcttcttg ttgctcttgg atggcagctt taccttcatc ctagacacat 7680
gctcaggact aagcactacg atgagcttgc tatgctcgga atcagatacg gacttgttgg 7740
ataccttgct gctaactacg gtgctggata cgttctcgct tgttaccttc tttacgttca 7800
gcttggagct atgtacatct tctgcaactt cgctgtttct catactcacc tccctgttgt 7860
tgagcctaac gagcatgcta cttgggttga gtacgctgct aaccacacta ctaactgttc 7920
tccatcttgg tggtgtgatt ggtggatgtc ttaccttaac taccagatcg agcaccacct 7980
ttacccttct atgcctcaat tcagacaccc taagatcgct cctagagtta agcagctttt 8040
cgagaagcac ggacttcact acgatgttag aggatacttc gaggctatgg ctgatacttt 8100
cgctaacctt gataacgttg cccatgctcc tgagaagaaa atgcagtaat gagatcgttc 8160
aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt gccggtcttg cgatgattat 8220
catataattt ctgttgaatt acgttaagca cgtaataatt aacatgtaat gcatgacgtt 8280
atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta tacatttaat acgcgataga 8340
aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc gcggtgtcat ctatgttact 8400
agatcggtcg attaaaaatc ccaattatat ttggtctaat ttagtttggt attgagtaaa 8460
acaaattcga accaaaccaa aatataaata tatagttttt atatatatgc ctttaagact 8520
ttttatagaa ttttctttaa aaaatatcta gaaatatttg cgactcttct ggcatgtaat 8580
atttcgttaa atatgaagtg ctccatttttt attaacttta aataattggt tgtacgatca 8640
ctttcttatc aagtgttact aaaatgcgtc aatctctttg ttcttccata ttcatatgtc 8700
aaaatctatc aaaattctta tatatctttt tcgaatttga agtgaaattt cgataattta 8760
aaattaaata gaacatatca ttatttaggt atcatattga tttttatact taattactaa 8820
atttggttaa ctttgaaagt gtacatcaac gaaaaattag tcaaacgact aaaataaata 8880
aatatcatgt gttattaaga aaattctcct ataagaatat tttaatagat catatgtttg 8940
taaaaaaaat taatttttac taacacatat atttacttat caaaaatttg acaaagtaag 9000
attaaaataa tattcatcta acaaaaaaaa aaccagaaaa tgctgaaaac ccggcaaaac 9060
cgaaccaatc caaaccgata tagttggttt ggtttgattt tgatataaac cgaaccaact 9120

cggtccattt gcaccctaa tcataatagc tttaatattt caagatatta ttaagttaac 9180
gttgtcaata tcctggaaat tttgcaaaat gaatcaagcc tatatggctg taatatgaat 9240
ttaaaagcag ctcgatgtgg tggtaatatg taatttactt gattctaaaa aaatatccca 9300
agtattaata atttctgcta ggaagaaggt tagctacgat ttacagcaaa gccagaatac 9360
aaagaaccat aaagtgattg aagctcgaaa tatacgaagg aacaaatatt tttaaaaaaa 9420
tacgcaatga cttggaacaa aagaaagtga tatatttttt gttcttaaac aagcatcccc 9480
tctaaagaat ggcagttttc ctttgcatgt aactattatg ctcccttcgt tacaaaaatt 9540
ttggactact attgggaact tcttctgaaa atagtgatag aacccacacg agcatgtgct 9600
ttccatttaa ttttaaaaac caagaaacat acatacataa cattccatca gcctctctct 9660
ctttttatta cggttaatga cttaaaacac atcttattat cccatccttа acacctagca 9720
gtgtctttat acgatctcat cgatcaccac ttcaaaacca tgcagactgc tgctgccccc 9780
ggagctggca tcggctaggc tgggtgccgc actgtcccgg aaggtcccta gcgacttgtt 9840
tagattgatg ggaccacctc tcaacttcct gctgctgtcc ctgctgctgg atgtcctgcc 9900
tcatctggcc gattgcacgc tccagtcccc tgcatgtgca ctcgctcctc aattgcttaa 9960
gatcatcgca gcagctatcg aagtgctggc tctgttgccc tcctccacgg ccttggttgt 10020
agtagtagct gccgccgccc ttctggactt tttcccacag gaaccgccga ataattcgat 10080
agaaccacac gagcatgtgc tttcatttat tttaaaaacc aagaaacata cataacattt 10140
catcagcctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctt 10200
tattacagct gttacactaa cttaaaacac attcatctca ttattattat tattatccat 10260
ccttaacacc tagcagtgtc tttgtacgat ctcataatcg atcacccctt catcaggtat 10320
ccttaggctt cactccaacg ttgttgcagt tacggaacat gtacacacca tcatggttct 10380
caacgaactg gcaagatctc caagttttcc aaaggctaac ccacatgttc tcatcggtgt 10440
gtctgtagtg ctctcccata actttcttga tgcactcggt agcttctcta gcatggtaga 10500
atgggatcct tgaaacgtag tgatggagca catgagtctc gatgatgtca tggaagatga 10560
ttccgaggat tccgaactct ctatcgatag tagcagcagc acccttagcg aaagtccact 10620
cttgagcatc gtaatgaggc atagaagaat cggtgtgctg aaggaaggta acgaaaacaa 10680
gccagtggtt aacaaggatc caaggacaga accatgtgat gaaagtaggc cagaatccga 10740
aaaccttgta agcggtgtaa acagaagtga gggtagcaag gattccaaga tcagaaagaa 10800
cgatgtacca gtagtcttc ttatcgaaaa cagggctaga aggccagtag tgagacttga 10860
agaacttaga aacaccaggg taaggttgtc cagtagcgtt agtagcaagg taaagagaaa 10920
gtcctccaag ctgttggaac aagagagcga aaacagagta gataggagtt tcctcagcga 10980

tatcgtgaag gctggtaact tggtgcttct ctttgaattc ctcggcggtg taaggaacga 11040

aaaccatatc tctggtcatg tgtccagtag ccttatggtg cttagcatga gagaacttcc 11100

agctgaagta aggaaccata acaagagagt ggagaaccca tccaacggta tcgttaaccc 11160

atccgtagtt agagaaagca gaatgtccac actcatgtcc aaggatccag attccgaatc 11220

cgaaacaaga gatagagaac acgtaagcag accaagcagc gaatctaagg aattcgttag 11280

ggagaagagg gatgtaggta agtccaacgt aagcgatagc agagatagcc acgatatctc 11340

tcaccacgta agacatagac ttcacgagag atctctcgta acagtgctta gggatagcgt 11400

caaggatatc cttgatggtg taatctggca ccttgaaaac gtttccgaag gtatcgatag 11460

cggtcttttg ctgcttgaaa gatgcaacgt ttccagaacg cctaacggtc ttagtagatc 11520

cctcaaggat ctcagatcca gacacggtaa ccttagacat ggtatggtaa ttgtaaatgt 11580

aattgtaatg ttgtttgttg tttgttgttg ttggtaattg ttgtaaaatt tttggtggtg 11640

attggttctt taaggtgtga gagtgagttg tgagttgtgt ggtgggtttg gtgagattgg 11700

ggatggtggg tttatatagt ggagactgag gaatggggtc gtgagtgtta actttgcatg 11760

ggctacacgt gggttctttt gggcttacac gtagtattat tcatgcaaat gcagccaata 11820

catatacggt attttaataa tgtgtgggaa tacaatatgc cgagtatttt actaattttg 11880

gcaatgacaa gtgtacattt ggattatctt acttggcctc tcttgcttta atttggatta 11940

tttttattct cttaccttgg ccgttcatat tcacatccct aaaggcaaga cagaattgaa 12000

tggtggccaa aaattaaaac gatggatatg acctacatag tgtaggatca attaacgtcg 12060

aaggaaaata ctgattctct caagcatacg gacaagggta aataacatag tcaccagaac 12120

ataataaaca aaaagtgcag aagcaagact aaaaaaatta gctatggaca ttcaggttca 12180

tattggaaac atcattatcc tagtcttgtg accatccttc ctcctgctct agttgagagg 12240

ccttgggact aacgagaggt cagttgggat agcagatcct tatcctggac tagcctttct 12300

ggtgtttcag agtcttcgtg ccgccgtcta catctatctc cattaggtct gaagatgact 12360

cttcacacca acgacgttta aggtctctat cctactccta gcttgcaata cctggcttgc 12420

aatacctgga gcatcgtgca cgatgattgg atactgtgga ggaggagtgt ttgctgattt 12480

agagctcccg gttgggtgat ttgacttcga tttcagttta ggcttgttga aatttttcag 12540

gttccattgt gaagccttta gagcttgagc ttccttccat gttaatgcct tgatcgaata 12600

ctcctagaga aaagggaagt cgatctctga gtattgaaat cgaagtgcac atttttttte 12660

aacgtgtcca atcaatccac aaacaaagca gaagacaggt aatctttcat acttatactg 12720

acaagtaata gtcttaccgt catgcataat aacgtctcgt tccttcaaga ggggttttcc 12780

gacatccata acgacccgaa gcctcatgaa agcattaggg aagaactttt ggttcttctt 12840

gtcatggcct ttataggtgt cagccgagct cgccaattcc cgtccgactg gctccgcaaa 12900

atattcgaac ggcaagttat ggacttgcaa ccataactcc acggtattga gcaggaccta 12960

ttgtgaagac tcatctcatg gagcttcaga atgtggttgt cagcaaacca atgaccgaaa 13020

tccatcacat gacggacgtc cagtgggtga gcgaaacgaa acaggaagcg cctatctttc 13080

agagtcgtga gctccacacc ggattccggc aactacgtgt tgggcaggct tcgccgtatt 13140

agagatatgt tgaggcagac ccatctgtgc cactcgtaca attacgagag ttgtttttt 13200

tgtgattttc ctagtttctc gttgatggtg agctcatatt ctacatcgta tggtctctca 13260

acgtcgtttc ctgtcatctg atatcccgtc atttgcatcc acgtgcgccg cctcccgtgc 13320

caagtcccta ggtgtcatgc acgccaaatt ggtggtggtg cgggctgccc tgtgcttctt 13380

accgatgggt ggaggttgag tttgggggtc tccgcggcga tggtagtggg ttgacggttt 13440

ggtgtgggtt gacggcattg atcaatttac ttcttgcttc aaattctttg gcagaaaaca 13500

attcattaga ttagaactgg aaaccagagt gatgagacgg attaagtcag attccaacag 13560

agttacatct cttaagaaat aatgtaaccc ctttagactt tatatatttg caattaaaaa 13620

aataatttaa cttttagact ttatatatag ttttaataac taagtttaac cactctatta 13680

tttatatcga aactatttgt atgtctcccc tctaaataaa cttggtattg tgtttacaga 13740

acctataatc aaataatcaa tactcaactg aagtttgtgc agttaattga agggattaac 13800

ggccaaaatg cactagtatt atcaaccgaa tagattcaca ctagatggcc atttccatca 13860

atatcatcgc cgttcttctt ctgtccacat atcccctctg aaacttgaga gacacctgca 13920

cttcattgtc cttattacgt gttacaaaat gaaacccatg catccatgca aactgaagaa 13980

tggcgcaaga acccttcccc tccatttctt atgtggcgac catccatttc accatctccc 14040

gctataaaac acccccatca cttcacctag aacatcatca ctacttgctt atccatccaa 14100

aagataccca cttttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac attacaatta 14160

catttacaat taccatacca tgccacctag cgctgctaag caaatgggag cttctactgg 14220

tgttcatgct ggtgttactg actcttctgc tttcaccaga aaggatgttg ctgatagacc 14280

tgatctcacc atcgttggag attctgttta cgatgctaag gctttcagat ctgagcatcc 14340

tggtggtgct catttcgttt ctttgttcgg aggaagagat gctactgagg ctttcatgga 14400

ataccataga agggcttggc ctaagtctag aatgtctaga ttccacgttg gatctcttgc 14460

ttctactgag gaacctgttg ctgctgatga gggatacctt caactttgtg ctaggatcgc 14520

taagatggtg ccttctgttt cttctggatt cgctcctgct tcttactggg ttaaggctgg 14580

acttatcctt ggatctgcta tcgctcttga ggcttacatg ctttacgctg gaaagagact 14640

tctcccttct atcgttcttg gatggctttt cgctcttatc ggtcttaaca tccagcatga 14700

tgctaaccat ggtgctttgt ctaagtctgc ttctgttaac cttgctcttg gactttgtca 14760

ggattggatc ggaggatcta tgatcctttg gcttcaagag catgttgtta tgcaccacct 14820

ccacactaac gatgttgata aggatcctga tcaaaaggct cacggtgctc ttagactcaa 14880

gcctactgat gcttggtcac ctatgcattg gcttcagcat ctttaccttt tgcctggtga 14940

gactatgtac gctttcaagc ttttgttcct cgacatctct gagcttgtta tgtggcgttg 15000

ggagggtgag cctatctcta agcttgctgg atacctcttt atgccttctt tgcttctcaa 15060

gcttaccttc tgggctagat tcgttgcttt gcctctttac cttgctcctt ctgttcatac 15120

tgctgtgtgt atcgctgcta ctgttatgac tggatctttc tacctcgctt tcttcttctt 15180

catctcccac aacttcgagg gtgttgcttc tgttggacct gatggatcta tcacttctat 15240

gactagaggt gctagcttcc ttaagagaca agctgagact tcttctaacg ttggaggacc 15300

tcttcttgct actcttaacg gtggactcaa ctaccaaatt gagcatcact tgttccctag 15360

agttcaccat ggattctacc ctagacttgc tcctcttgtt aaggctgagc ttgaggctag 15420

aggaatcgag tacaagcact accctactat ctggtctaac cttgcttcta ccctcagaca 15480

tatgtacgct cttggaagaa ggcctagatc taaggctgag taatgacaag cttatgtgac 15540

gtgaaataat aacggtaaaa tatatgtaat aataataata ataaagccac aaagtgagaa 15600

tgaggggaag gggaaatgtg taatgagcca gtagccggtg gtgctaattt tgtatcgtat 15660

tgtcaataaa tcatgaattt tgtggttttt atgtgttttt ttaaatcatg aattttaaat 15720

tttataaaat aatctccaat cggaagaaca acattccata tccatgcatg gatgtttctt 15780

tacccaaatc tagttcttga gaggatgaag catcaccgaa cagttctgca actatccctc 15840

aaaagcttta aaatgaacaa caaggaacag agcaacgttc caaagatccc aaacgaaaca 15900

tattatctat actaatacta tattattaat tactactgcc cggaatcaca atcgctgaat 15960

gattcctatt aactacaagc cttgttggcg gcggagaagt gatcggcgcg gcgagaagca 16020

gcggactcgg agacgaggcc ttggaagatc tgagtcgaac gggcagaatc agtattttcc 16080

ttcgacgtta attgatccta cactatgtag gtcatatcca tcgttttaat ttttggccac 16140

cattcaattc tgtcttgcct ttagggatgt gaatatgaac ggccaaggta agagaataaa 16200

aataatccaa attaaagcaa gagaggccaa gtaagataat ccaaatgtac acttgtcatt 16260

gccaaaatta gtaaaatact cggcatattg tattcccaca cattattaaa ataccgtata 16320

tgtattggct gcatttgcat gaataatact acgtgtaagc ccaaaagaac ccacgtgtag 16380

cccatgcaaa gttaacactc acgaccccat tcctcagtct ccactatata aacccaccat 16440

ccccaatctc accaaaccca ccacacaact cacaactcac tctcacacct taaagaacca 16500

atcaccacca aaaattttac aacaattacc aacaacaaca aacaacaaac aacattacaa 16560

ttacatttac aattaccata ccatgagcgc tgttaccgtt actggatctg atcctaagaa 16620

cagaggatct tctagcaaca ccgagcaaga ggttccaaaa gttgctatcg ataccaacgg 16680

aaacgtgttc tctgttcctg atttcaccat caaggacatc cttggagcta tccctcatga 16740

gtgttacgag agaagattgg ctacctctct ctactacgtg ttcagagata tcttctgcat 16800

gcttaccacc ggatacctta cccataagat cctttaccct ctcctcatct cttacacctc 16860

taacagcatc atcaagttca ctttctgggc cctttacact tacgttcaag gacttttcgg 16920

aaccggaatc tgggttctcg ctcatgagtg tggacatcaa gctttctctg attacggaat 16980

cgtgaacgat ttcgttggat ggacccttca ctcttacctt atggttcctt acttcagctg 17040

gaagtactct catggaaagc accataaggc tactggacac atgaccagag atatggtttt 17100

cgttcctgcc accaaagagg aattcaagaa gtctaggaac ttcttcggta acctcgctga 17160

gtactctgag gattctccac ttagaaccct ttacgagctt cttgttcaac aacttggagg 17220

atggatcgct tacctcttcg ttaacgttac aggacaacct taccctgatg ttccttcttg 17280

gaaatggaac cacttctggc ttacctctcc acttttcgag caaagagatg ctctctacat 17340

cttcctttct gatcttggaa tcctcaccca gggaatcgtt cttactcttt ggtacaagaa 17400

attcggagga tggtcccttt tcatcaactg gttcgttcct tacatctggg ttaaccactg 17460

gctcgttttc atcacattcc ttcagcacac tgatcctact atgcctcatt acaacgctga 17520

ggaatggact ttcgctaagg gtgctgctgc tactatcgat agaaagttcg gattcatcgg 17580

acctcacatc ttccatgata tcatcgagac tcatgtgctt caccactact gttctaggat 17640

cccattctac aacgctagac ctgcttctga ggctatcaag aaagttatgg gaaagcacta 17700

caggtctagc gacgagaaca tgtggaagtc actttggaag tctttcaggt cttgccaata 17760

cgttgacggt gataacggtg ttctcatgtt ccgtaacatc aacaactgcg gagttggagc 17820

tgctgagaag taatgaaggg gtgatcgatt atgagatcgt acaaagacac tgctaggtgt 17880

taaggatgga taataataat aataatgaga tgaatgtgtt ttaagttagt gtaacagctg 17940

taataaagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagaggc 18000

tgatgaaatg ttatgtatgt ttcttggttt ttaaaataaa tgaaagcaca tgctcgtgtg 18060

gttctatcga attattcggc ggttcctgtg ggaaaaagtc cagaagggcc gccgcagcta 18120

ctactacaac caaggccgtg gaggagggca acagagccag cacttcgata gctgctgcga 18180

tgatcttaag caattgagga gcgagtgcac atgcagggga ctggagcgtg caatcggcca 18240

gatgaggcag gacatccagc agcagggaca gcagcaggaa gttgagaggt ggtcccatca 18300

atctaaacaa gtcgctaggg accttccggg acagtgcggc acccagccta gccgatgcca 18360

gctccagggg cagcagcagt ctgcatggtt ttgaagtggt gatcgatgag atcgtataaa 18420

gacactgcta ggtgttaagg atgggataat aagatgtgtt ttaagtcatt aaccgtaata 18480

aaaagagaga gaggctgatg gaatgttatg tatgtatgtt tcttggtttt taaaattaaa 18540

tggaaagcac atgctcgtgt gggttctatc tcgattaaaa atcccaatta tatttggtct 18600
aatttagttt ggtattgagt aaaacaaatt cgaaccaaac caaaatataa atatatagtt 18660
tttatatata tgcctttaag acttttttata gaattttctt taaaaaatat ctagaaatat 18720
ttgcgactct tctggcatgt aatatttcgt taaatatgaa gtgctccatt tttattaact 18780
ttaaataatt ggttgtacga tcactttctt atcaagtgtt actaaaatgc gtcaatctct 18840
ttgttcttcc atattcatat gtcaaaatct atcaaaattc ttatatatct ttttcgaatt 18900
tgaagtgaaa tttcgataat ttaaaattaa atagaacata tcattattta ggtatcatat 18960
tgatttttat acttaattac taaatttggt taactttgaa agtgtacatc aacgaaaaat 19020
tagtcaaacg actaaaataa ataaatatca tgtgttatta agaaaattct cctataagaa 19080
tattttaata gatcatatgt ttgtaaaaaa aattaatttt tactaacaca tatatttact 19140
tatcaaaaat ttgacaaagt aagattaaaa taatattcat ctaacaaaaa aaaaaccaga 19200
aaatgctgaa aacccggcaa aaccgaacca atccaaaccg atatagttgg tttggtttga 19260
ttttgatata aaccgaacca actcggtcca tttgcacccc taatcataat agctttaata 19320
tttcaagata ttattaagtt aacgttgtca atatcctgga aattttgcaa aatgaatcaa 19380
gcctatatgg ctgtaatatg aatttaaaag cagctcgatg tggtggtaat atgtaattta 19440
cttgattcta aaaaaatatc ccaagtatta ataatttctg ctaggaagaa ggttagctac 19500
gatttacagc aaagccagaa tacaaagaac cataaagtga ttgaagctcg aaatatacga 19560
aggaacaaat atttttaaaa aaatacgcaa tgacttggaa caaaagaaag tgatatattt 19620
tttgttctta aacaagcatc ccctctaaag aatggcagtt ttcctttgca tgtaactatt 19680
atgctccctt cgttacaaaa attttggact actattggga acttcttctg aaaatagtcc 19740
tgcaggctag tagattggtt ggttggtttc catgtaccag aaggcttacc ctattagttg 19800
aaagttgaaa ctttgttccc tactcaattc ctagttgtgt aaatgtatgt atatgtaatg 19860
tgtataaaac gtagtactta aatgactagg agtggttctt gagaccgatg agagatggga 19920
gcagaactaa agatgatgac ataattaaga acgaatttga aaggctctta ggtttgaatc 19980
ctattcgaga atgtttttgt caaagatagt ggcgattttg aaccaaagaa aacatttaaa 20040
aaatcagtat ccggttacgt tcatgcaaat agaaagtggt ctaggatctg attgtaattt 20100
tagacttaaa gagtctctta agattcaatc ctggctgtgt acaaaactac aaataatata 20160
ttttagacta tttggcctta actaaacttc cactcattat ttactgaggt tagagaatag 20220
acttgcgaat aaacacattc ccgagaaata ctcatgatcc cataattagt cagagggtat 20280
gccaatcaga tctaagaaca cacattccct caaattttaa tgcacatgta atcatagttt 20340
agcacaattc aaaaataatg tagtattaaa gacagaaatt tgtagacttt tttttggcgt 20400
taaaagaaga ctaagtttat acgtacattt tattttaagt ggaaaaccga aattttccat 20460

cgaaatatat gaatttagta tatatatttc tgcaatgtac tattttgcta ttttggcaac 20520
tttcagtgga ctactacttt attacaatgt gtatggatgc atgagtttga gtatacacat 20580
gtctaaatgc atgctttgta aaacgtaacg gaccacaaaa gaggatccat acaaatacat 20640
ctcatagctt cctccattat tttccgacac aaacagagca ttttacaaca attaccaaca 20700
acaacaaaca acaaacaaca ttacaattac atttacaatt accataccat ggaatttgct 20760
caacctctcg ttgctatggc tcaagagcag tacgctgcta tcgatgctgt tgttgctcct 20820
gctatcttct ctgctaccga ctctattgga tggggactca agcctatctc ttctgctact 20880
aaggatctcc ctctcgttga atctcctacc cctcttatcc tttctctcct cgcttacttc 20940
gctatcgttg gttctggact cgtttaccgt aaagtgttcc ctagaaccgt taagggacag 21000
gatcctttcc ttctcaaggc tcttatgctc gctcacaacg ttttccttat cggactcagc 21060
ctttacatgt gcctcaagct cgtttacgag gcttacgtga acaagtactc cttctgggga 21120
aacgcttaca accctgctca aaccgagatg gctaaggtga tctggatctt ctacgtgtcc 21180
aagatctacg agttcatgga caccttcatc atgcttctca agggaaacgt taaccaggtt 21240
tccttcctcc atgtttacca ccacggatct atctctggaa tctggtggat gatcacttat 21300
gctgctccag gtggagatgc ttacttctct gctgctctca actcttgggt tcatgtgtgc 21360
atgtacacct actacttcat ggctgctgtt cttcctaagg acgaaaagac caagagaaag 21420
taccttggt ggggaagata ccttacccag atgcaaatgt tccagttctt catgaacctt 21480
ctccaggctg tttacctcct ctactcttct tctccttacc ctaagttcat tgctcaactc 21540
ctcgttgttt acatggttac cctcctcatg cttttcggaa acttctacta catgaagcac 21600
cacgcttcta agtgataagg gccgccgcca tgtgacagat cgaaggaaga aagtgtaata 21660
agacgactct cactactcga tcgctagtga ttgtcattgt tatatataat aatgttatct 21720
ttcacaactt atcgtaatgc atgtgaaact ataacacatt aatcctactt gtcatatgat 21780
aacactctcc ccatttaaaa ctcttgtcaa tttaaagata taagattctt taaatgatta 21840
aaaaaaatat attataaatt caatcactcc tactaataaa ttattaatta ttatttattg 21900
attaaaaaaa tacttatact aatttagtct gaatagaata attagattct agcctgcagg 21960
gcggccgcgg atcccatgga gtcaaagatt caaatagagg acctaacaga actcgccgta 22020
aagactggcg aacagttcat acagagtctc ttacgactca atgacaagaa gaaaatcttc 22080
gtcaacatgg tggagcacga cacacttgtc tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca 22140
gaagaccaaa gggcaattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga 22200
ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 22260
tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt 22320

ggtcccaaag atggacccc acccacgagg agcatcgtgg aaaaagaaga cgttccaacc 22380
acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga tgacgcacaa 22440
tcccactatc cttcgcaaga cccttcctct atataaggaa gttcatttca tttggagaga 22500
acacgggggga ctgaattaaa tatgagccct gagaggcgtc ctgttgaaat cagacctgct 22560
actgctgctg atatggctgc tgtttgtgat atcgtgaacc actacatcga gacttctacc 22620
gttaacttca gaactgagcc tcaaactcct caagagtgga tcgatgatct tgagagactc 22680
caagatagat acccttggct tgttgctgag gttgagggtg ttgttgctgg aatcgcttac 22740
gctggacctt ggaaggctag aaacgcttac gattggactg ttgagtctac cgtttacgtt 22800
tcacacagac atcagagact tggacttgga tctacccttt acactcacct tctcaagtct 22860
atggaagctc agggattcaa gtctgttgtt gctgttatcg gactccctaa cgatccttct 22920
gttagacttc atgaggctct tggatacact gctagaggaa ctcttagagc tgctggatac 22980
aagcacggtg gatggcatga tgttggattc tggcaaagag atttcgagct tcctgctcct 23040
cctagacctg ttagaccagt tactcagatc tgaatttgcg tgatcgttca aacatttggc 23100
aataaagttt cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc 23160
tgttgaatta cgttaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat 23220
gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat 23280
agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cggtgtcatc tatgttacta gatcactagt 23340
gatgtacggt taaaaccacc ccagtacatt aaaaacgtcc gcaatgtgtt attaagttgt 23400
ctaagcgtca atttgtttac accacaatat atcctgccac cagccagcca acagctcccc 23460
gaccggcagc tcggcacaaa atcaccactc gatacaggca gcccatcagt cc 23512

<210> 3
<211> 25787
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência de nucleótidos de pGA7- mod_C

<400> 3

```
tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttcca cgccctttta      60
aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg     120
tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag     180
tcacgacgtt gtaaaacggg cgccccgatc tagtaacata gatgacaccg cgcgcgataa     240
tttatcctag tttgcgcgct atattttgtt ttctatcgcg tattaaatgt ataattgcgg     300
gactctaatc ataaaaaccc atctcataaa taacgtcatg cattacatgt taattattac     360
gtgcttaacg taattcaaca gaaattatat gataatcatc gcaagaccgg caacaggatt     420
```

caatcttaag aaactttatt gccaaatgtt tgaacgatct gcccggaagc ggccaactcg 480

aaaatttaat taatcatcag tgagccttct cagcctttcc gttaacgtag tagtgctgtc 540

caactttgtc gaggttgctg aaagtagcct tccaagcacc gtagtaagag agcaccttgt 600

agttgagtcc ccacttctta gcgaaagggg cgaatcttct tgacacctca ggctgtctga 660

attgaggcat atcagggaag agatggtgga taacctggca gttaaggtat cccataagcc 720

agttaacgta tccacgagaa ggatcgatgt caacggtgtg atcaacagcg tagttaaccc 780

agctaaggtg cttgtcagat ggaacaacag ggaggtgagt gtgagaagta gagaagtgag 840

cgaagaggta catgtaagcg atccagtttc cgaaagtgaa ccaccagtaa gcaacaggcc 900

aagagtatcc ggtagcaagc ttgataacag cggttctaac aacgtgagaa acgagcatcc 960

aagaagcttc ctcgtagttc ttcttcctga gcacctgtct aggatggaga acgtagatcc 1020

agaaagcctg aacgagaagt ccagaagtaa caggaacgaa ggtccaagct tgaagtctag 1080

cccaagctct agagaatccc ctaggtctat tatcctccac agcggtgttg aagaaagcca 1140

cagcaggagt ggtatcaaga tccatgtcgt gtctaacttt ctgaggggta gcatggtgct 1200

tgttatgcat ctggttccac atctctccgc tggtagaaag tccgaatccg caagtcatag 1260

cctgaagtct cttatccacg tacacagatc cggtaagaga gttgtgtcca ccctcatgtt 1320

gaacccatcc acatctagct ccgaagaaag caccgtacac aacgctagca atgatagggt 1380

atccagcgta cataagagcg gttccaagag cgaaagtagc aagaagctcc aaaagacggt 1440

aagcaacatg ggtgatagaa ggcttgaaga atccgtccct ctcaagttca gctctccacc 1500

tagcgaaatc ctcaagcata ggagcatcct cagactcaga tctcttgatc tcagcaggtc 1560

tagaaggcaa agctctaagc atcttccaag ccttgaggct acgcatgtga aattctttga 1620

aagcctcagt agcatcagca ccagtgttag caagcatgta gaagatcacg cttccaccag 1680

gatgtttgaa gttggtcacg tcgtactcaa catcctcaac cctaacccat ctagtctcga 1740

aggtagcagc aagttcatga ggctcaaggg tcttaagatc aacaggagcg gtagaagcat 1800

ccttagcatc aagagcctca gcagatgact tagacctggt gagaggagat ctaggagaag 1860

atcttccatc ggtcttagga ggacacatgg cgcgccgatt ttcgagatgg taattgtaaa 1920

tgtaattgta atgttgtttg ttgtttgttg ttgttggtaa ttgttgtaaa attcgagttg 1980

gccgcttccg gggatcctcg tgtatgtttt taatcttgtt tgtatcgatg agttttggtt 2040

tgagtaaaga gtgaagcgga tgagttaatt tataggctat aaaggagatt tgcatggcga 2100

tcacgtgtaa taatgcatgc acgcatgtga ttgtatgtgt gtgctgtgag agagaagctc 2160

ttaggtgttt gaagggagtg acaagtggcg aagaaaaaca attctccgcg gctgcatgct 2220

atgtgtaacg tgtagctaat gttctggcat ggcatcttat gaacgattct ttttaaaaac 2280

aaggtaaaaa cttaacttca taaaattaaa aaaaaaaacg tttactaagt tggtttaaaa 2340

ggggatgaga ggcgcccccgc ggaaagcttg ctagccaatt ggggccccaac gttctcgagt 2400

ttttctagaa ggaaactgaa ggcgggaaac gacaatctgc tagtggatct cccagtcacg 2460

acgttgtaaa acgggcgccc cgcggaaagc ttgcggccgc ggtaccgccc gttcgactca 2520

gatcttccaa ggcctcgtct ccgagtccgc tgcttctcgc cgcgccgatc acttctccgc 2580

cgccaacaag gcttgtagtt aataggaatc attcagggat tgtgattccg ggcagtagta 2640

attaataata tagtattagt atagataata tgtttcgttt gggatctttg gaacgttgct 2700

ctgttccttg ttgttcattt taaagctttt gagggatagt tgcagaactg ttcggtgatg 2760

cttcatcctc tcaagaacta gatttgggta aagaaacatc catgcatgga tatggaatgt 2820

tgttcttccg attggagatt attttataaa atttaaaatt catgatttaa aaaaacacat 2880

aaaaaccaca aaattcatga tttattgaca atacgataca aaattagcac caccggctac 2940

tggctcatta cacatttccc cttcccctca ttctcacttt gtggctttat tattattatt 3000

attacatata ttttaccgtt attatttcac gtcacataag cttgttaatt aatcattagt 3060

gagccttctc agcctttccg ttaacgtagt agtgctgtcc caccttatca aggttagaga 3120

aagtagcctt ccaagcaccg tagtaagaga gcaccttgta gttgagtccc cacttcttag 3180

cgaaaggaac gaatcttctg ctaacctcag gctgtctgaa ttgaggcata tcagggaaga 3240

ggtggtggat aacctgacag ttaaggtatc ccataagcca gttcacgtat cctctagaag 3300

gatcgatatc aacggtgtga tcaacagcgt agttaaccca agaaaggtgc ttatcagatg 3360

gaacaacagg gaggtgagta tgagaagtag agaagtgagc gaaaaggtac atgtaagcga 3420

tccagtttcc gaaagtgaac caccagtaag caacaggcca agagtatcca gtagcaagct 3480

tgataacagc ggttctaaca acatgagaaa cgagcatcca agaagcctct tcgtagttct 3540

tcttacggag aacttgtcta gggtggagaa cgtagatcca gaaagcttga acaagaagtc 3600

cagaggtaac aggaacgaaa gtccaagctt gaagtctagc ccaagctcta gagaatcctc 3660

taggtctgtt atcctcaaca gcagtgttga agaaagccac agcaggagtg gtatcaagat 3720

ccatatcgtg tctaaccttt tgaggggtag catggtgctt gttatgcatc tggttccaca 3780

tctcaccaga agtagaaagt ccgaatccac aagtcatagc ctgaagtctc ttgtccacgt 3840

aaacagatcc ggtaagagag ttatgtccac cctcatgttg aacccatcca catctagctc 3900

cgaagaaagc accgtaaaca acagaagcaa tgatagggta tccagcgtac ataagagcag 3960

ttccaagagc gaatgtagca agaagctcga gaagtctgta agccacatgg gtgatagaag 4020

gcttgaagaa tccatctctc tcaagctcag cacgccatct agcgaaatcc tcaagcatag 4080

gagcatcctc agactcagat ctcttgatct cagcaggtct agaaggcaaa gctctaagca 4140

tcttccaagc cttgagagaa cgcatgtgga attctttgaa agcctcagta gcatcagcac 4200

cagtgttagc aagcatgtag aagatcacag atccaccagg gtgcttgaag ttagtcacat 4260

cgtactcaac gtcctcaact ctaacccatc tagtctcgaa agtagcagca agctcatgag 4320

gctcaagagt cttaagatca acaggagcag tagaagcatc cttagcatca agagcctcag 4380

cagaagattt agacctggta agtggagatc taggagaaga tcttccatca gtcttaggag 4440

ggcacatggt atggtaattg taaatgtaat tgtaatgttg tttgttgttt gttgttgttg 4500

gtaattgttg taaaattaat taagtgggta tcttttggat ggataagcaa gtagtgatga 4560

tgttctaggt gaagtgatgg gggtgtttta tagcgggaga tggtgaaatg gatggtcgcc 4620

acataagaaa tggaggggaa gggttcttgc gccattcttc agtttgcatg gatgcatggg 4680

tttcattttg taacacgtaa taaggacaat gaagtgcagg tgtctctcaa gtttcagagg 4740

ggatatgtgg acagaagaag aacggcgatg atattgatgg aaatggccat ctagtgtgaa 4800

tctattcggt tgataatact agtgcatttt ggccgttaat cccttcaatt aactgcacaa 4860

acttcagttg agtattgatt atttgattat aggttctgta aacacaatac caagtttatt 4920

tagaggggag acatacaaat agtttcgata taaataatag agtggttaaa cttagttatt 4980

aaaactatat ataaagtcta aaagttaaat tatttttta attgcaaata tataaagtct 5040

aaaggggtta cattatttct taagagatgt aactctgttg gaatctgact taatccgtct 5100

catcactctg gtttccagtt ctaatctaat gaattgtttt ctgccaaaga atttgaagca 5160

agaagtaaat tgatcaatgc cgtcaaccca caccaaaccg tcaacccact accatcgccg 5220

cggagacccc caaactcaac ctccacccat cggtaagaag cacagggcag cccgcaccac 5280

caccaatttg gcgtgcatga cacctaggga cttggcacgg gaggcggcgc acgtggatgc 5340

aaatgacggg atatcagatg acaggaaacg acgttgagag accatacgat gtagaatatg 5400

agctcaccat caacgagaaa ctaggaaaat cacaaaaaaa acaactctcg taattgtacg 5460

agtggcacag atgggtctgc ctcaacatat ctctaatacg gcgaagcctg cccaacacgt 5520

agttgccgga atccggtgtg gagctcacga ctctgaaaga taggcgcttc ctgtttcgtt 5580

tcgctcaccc actggacgtc cgtcatgtga tggatttcgg tcattggttt gctgacaacc 5640

acattctgaa gctccatgag atgagtcttc acaataggtc ctgctcaata ccgtggagtt 5700

atggttgcaa gtccataact tgccgttcga atattttgcg gagccagtcg gacgggaatt 5760

ggcgagctcg gctgacacct ataaaggcca tgacaagaag aaccaaaagt tcttccctaa 5820

tgctttcatg aggcttcggg tcgttatgga tgtcggaaaa cccctcttga aggaacgaga 5880

cgttattatg catgacggta agactattac ttgtcagtat aagtatgaaa gattacctgt 5940

cttctgcttt gtttgtggat tgattggaca cgttgaaaaa aaatgtgcac ttcgatttca 6000

atactcagag atcgacttcc cttttctcta ggagtattcg atcaaggcat taacatggaa 6060

ggaagctcaa gctctaaagg cttcacaatg gaacctgaaa aatttcaaca agcctaaact 6120

gaaatcgaag tcaaatcacc caaccgggag ctctaaatca gcaaacactc ctcctccaca 6180

gtatccaatc atcgtgcacg atgctccagg tattgcaagc caggtattgc aagctaggag 6240

taggatagag accttaaacg tcgttggtgt gaagagtcat cttcagacct aatggagata 6300

gatgtagacg gcggcacgaa gactctgaaa caccagaaag gctagtccag gataaggatc 6360

tgctatccca actgacctct cgttagtccc aaggcctctc aactagagca ggaggaagga 6420

tggtcacaag actaggataa tgatgtttcc aatatgaacc tgaatgtcca tagctaattt 6480

ttttagtctt gcttctgcac tttttgttta ttatgttctg gtgactatgt tatttaccct 6540

tgtccgtatg cttgagggta ccctagtaga ttggttggtt ggtttccatg taccagaagg 6600

cttaccctat tagttgaaag ttgaaacttt gttccctact caattcctag ttgtgtaaat 6660

gtatgtatat gtaatgtgta taaaacgtag tacttaaatg actaggagtg gttcttgaga 6720

ccgatgagag atgggagcag aactaaagat gatgacataa ttaagaacga atttgaaagg 6780

ctcttaggtt tgaatcctat tcgagaatgt ttttgtcaaa gatagtggcg attttgaacc 6840

aaagaaaaca tttaaaaaat cagtatccgg ttacgttcat gcaaatagaa agtggtctag 6900

gatctgattg taatttttaga cttaaagagt ctcttaagat tcaatcctgg ctgtgtacaa 6960

aactacaaat aatatatttt agactatttg gccttaacta aacttccact cattatttac 7020

tgaggttaga gaatagactt gcgaataaac acattcccga gaaatactca tgatcccata 7080

attagtcaga gggtatgcca atcagatcta agaacacaca ttcctctaaa ttttaatgca 7140

catgtaatca tagtttagca caattcaaaa ataatgtagt attaaagaca gaaatttgta 7200

gacttttttt tggcgttaaa agaagactaa gtttatacgt acattttatt ttaagtggaa 7260

aaccgaaatt ttccatcgaa atatatgaat ttagtatata tatttctgca atgtactatt 7320

ttgctatttt ggcaactttc agtggactac tactttatta caatgtgtat ggatgcatga 7380

gtttgagtat acacatgtct aaatgcatgc tttgtaaaac gtaacggacc acaaaagagg 7440

atccatacaa atacatctca tagcttcctc cattattttc cgacacaaac agagcatttt 7500

acaacaatta ccaacaacaa caaacaacaa acaacattac aattacattt acaattacca 7560

taccatggcc tctatcgcta tccctgctgc tcttgctgga actcttggat acgttacctа 7620

caatgtggct aaccctgata tcccagcttc tgagaaagtt cctgcttact tcatgcaggt 7680

tgagtactgg ggacctacta tcggaactat tggatacctc ctcttcatct acttcggaaa 7740

gcgtatcatg cagaacagat ctcaaccttt cggactcaag aacgctatgc tcgtttacaa 7800

cttctaccag accttcttca acagctactg catctacctt ttcgttactt ctcatagggc 7860

tcagggactt aaggtttggg gaaacatccc tgatatgact gctaactctt ggggaatctc 7920

tcaggttatc tggcttcact acaacaacaa gtacgttgag cttctcgaca ccttcttcat 7980

ggtgatgagg aagaagttcg accagctttc tttccttcac atctaccacc acactcttct 8040

catctggtca tggttcgttg ttatgaagct tgagcctgtt ggagattgct acttcggatc 8100

ttctgttaac accttcgtgc acgtgatcat gtactcttac tacggacttg ctgctcttgg 8160

agttaactgt ttctggaaga agtacatcac ccagatccag atgcttcagt tctgtatctg 8220

tgcttctcac tctatctaca ccgcttacgt tcagaatacc gctttctggc ttccttacct 8280

tcaactctgg gttatggtga acatgttcgt tctcttcgcc aacttctacc gtaagaggta 8340

caagtctaag ggtgctaaga agcagtgata aggcgcgcgg cgcgccgggc cgccgccatg 8400

tgacagatcg aaggaagaaa gtgtaataag acgactctca ctactcgatc gctagtgatt 8460

gtcattgtta tatataataa tgttatcttt cacaacttat cgtaatgcat gtgaaactat 8520

aacacattaa tcctacttgt catatgataa cactctcccc atttaaaact cttgtcaatt 8580

taaagatata agattcttta aatgattaaa aaaaatatat tataaattca atcactccta 8640

ctaataaatt attaattatt atttattgat taaaaaaata cttatactaa tttagtctga 8700

atagaataat tagattctag tctcatcccc ttttaaacca acttagtaaa cgttttttt 8760

tttaatttta tgaagttaag ttttcacctt gtttttaaaa agaatcgttc ataagatgcc 8820

atgccagaac attagctaca cgttacacat agcatgcagc cgcggagaat tgttttctt 8880

cgccacttgt cactcccttc aaacacctaa gagcttctct ctcacagcac acacatacaa 8940

tcacatgcgt gcatgcatta ttacacgtga tcgccatgca aatctccttt atagcctata 9000

aattaactca tccgcttcac tctttactca aaccaaaact catcgataca aacaagatta 9060

aaaacataca cgaggatctt ttacaacaat taccaacaac aacaaacaac aaacaacatt 9120

acaattacat ttacaattac cataccatgc ctccaaggga ctcttactct tatgctgctc 9180

ctccttctgc tcaacttcac gaagttgata ctcctcaaga gcacgacaag aaagagcttg 9240

ttatcggaga tagggcttac gatgttacca acttcgttaa gagacaccct ggtggaaaga 9300

tcattgctta ccaagttgga actgatgcta ccgatgctta caagcagttc catgttagat 9360

ctgctaaggc tgacaagatg cttaagtctc ttccttctcg tcctgttcac aagggatact 9420

ctccaagaag ggctgatctt atcgctgatt tccaagagtt caccaagcaa cttgaggctg 9480

agggaatgtt cgagccttct cttcctcatg ttgcttacag acttgctgag gttatcgcta 9540

tgcatgttgc tggtgctgct cttatctggc atggatacac tttcgctgga atcgctatgc 9600

ttggagttgt tcagggaaga tgtggatggc ttatgcatga gggtggacat tactctctca 9660

ctggaaacat tgctttcgac agagctatcc aagttgcttg ttacggactt ggatgtggaa 9720

tgtctggtgc ttggtggcgt aaccagcata acaagcacca tgctactcct caaaagcttc 9780

agcacgatgt tgatcttgat acccttcctc tcgttgcttt ccatgagaga atcgctgcta 9840

aggttaagtc tcctgctatg aaggcttggc tttctatgca agctaagctt ttcgctcctg 9900

ttaccactct tcttgttgct cttggatggc agctttacct tcatcctaga cacatgctca 9960

ggactaagca ctacgatgag cttgctatgc tcggaatcag atacggactt gttggatacc 10020

ttgctgctaa ctacggtgct ggatacgttc tcgcttgtta ccttctttac gttcagcttg 10080

gagctatgta catcttctgc aacttcgctg tttctcatac tcacctccct gttgttgagc 10140

ctaacgagca tgctacttgg gttgagtacg ctgctaacca cactactaac tgttctccat 10200

cttggtggtg tgattggtgg atgtcttacc ttaactacca gatcgagcac caccttacc 10260

cttctatgcc tcaattcaga caccctaaga tcgctcctag agttaagcag cttttcgaga 10320

agcacggact tcactacgat gttagaggat acttcgaggc tatggctgat actttcgcta 10380

accttgataa cgttgcccat gctcctgaga agaaaatgca gtaatgagat cgttcaaaca 10440

tttggcaata aagtttctta agattgaatc ctgttgccgg tcttgcgatg attatcatat 10500

aatttctgtt gaattacgtt aagcacgtaa taattaacat gtaatgcatg acgttattta 10560

tgagatgggt ttttatgatt agagtcccgc aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca 10620

aaatatagcg cgcaaactag gataaattat cgcgcgcggt gtcatctatg ttactagatc 10680

ggtcgattaa aaatcccaat tatatttggt ctaatttagt ttggtattga gtaaaacaaa 10740

ttcgaaccaa accaaaatat aaatatatag tttttatata tatgccttta agacttttta 10800

tagaattttc tttaaaaaat atctagaaat atttgcgact cttctggcat gtaatatttc 10860

gttaaatatg aagtgctcca tttttattaa ctttaaataa ttggttgtac gatcactttc 10920

ttatcaagtg ttactaaaat gcgtcaatct ctttgttctt ccatattcat atgtcaaaat 10980

ctatcaaaat tcttatatat ctttttcgaa tttgaagtga aatttcgata atttaaaatt 11040

aaatagaaca tatcattatt taggtatcat attgattttt atacttaatt actaaatttg 11100

gttaactttg aaagtgtaca tcaacgaaaa attagtcaaa cgactaaaat aaataaatat 11160

catgtgttat taagaaaatt ctcctataag aatattttaa tagatcatat gtttgtaaaa 11220

aaaattaatt tttactaaca catatattta cttatcaaaa atttgacaaa gtaagattaa 11280

aataatattc atctaacaaa aaaaaaacca gaaaatgctg aaaacccggc aaaaccgaac 11340

caatccaaac cgatatagtt ggtttggttt gattttgata taaaccgaac caactcggtc 11400

catttgcacc cctaatcata atagctttaa tatttcaaga tattattaag ttaacgttgt 11460

caatatcctg gaaattttgc aaaatgaatc aagcctatat ggctgtaata tgaatttaaa 11520

agcagctcga tgtggtggta atatgtaatt tacttgattc taaaaaaata tcccaagtat 11580

taataatttc tgctaggaag aaggttagct acgatttaca gcaaagccag aatacaaaga 11640

accataaagt gattgaagct cgaaatatac gaaggaacaa atatttttaa aaaaatacgc 11700

aatgacttgg aacaaaagaa agtgatatat tttttgttct taaacaagca tcccctctaa 11760

agaatggcag ttttcctttg catgtaacta ttatgctccc ttcgttacaa aaattttgga 11820

ctactattgg gaacttcttc tgaaaatagt gatagaaccc acacgagcat gtgctttcca 11880

tttaatttta aaaaccaaga aacatacata cataacattc catcagcctc tctctctttt 11940

tattacggtt aatgacttaa aacacatctt attatcccat ccttaacacc tagcagtgtc 12000

tttatacgat ctcatcgatc accacttcaa aaccatgcag actgctgctg cccctggagc 12060

tggcatcggc taggctgggt gccgcactgt cccggaaggt ccctagcgac ttgtttagat 12120

tgatgggacc acctctcaac ttcctgctgc tgtccctgct gctggatgtc ctgcctcatc 12180

tggccgattg cacgctccag tcccctgcat gtgcactcgc tcctcaattg cttaagatca 12240

tcgcagcagc tatcgaagtg ctggctctgt tgccctcctc cacggccttg gttgtagtag 12300

tagctgccgc cgcccttctg gacttttttcc cacaggaacc gccgaataat tcgatagaac 12360

cacacgagca tgtgctttca tttattttaa aaaccaagaa acatacataa catttcatca 12420

gcctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctttatta 12480

cagctgttac actaacttaa aacacattca tctcattatt attattatta tccatcctta 12540

acacctagca gtgtctttgt acgatctcat aatcgatcac ccattcatca ggtatcctta 12600

ggcttcactc caacgttgtt gcagttacgg aacatgtaca caccatcatg gttctcaacg 12660

aactggcaag atctccaagt tttccaaagg ctaacccaca tgttctcatc ggtgtgtctg 12720

tagtgctctc ccataacttt cttgatgcac tcggtagctt ctctagcatg gtagaatggg 12780

atccttgaaa cgtagtgatg gagcacatga gtctcgatga tgtcatggaa gatgattccg 12840

aggattccga actctctatc gatagtagca gcagcaccct tagcgaaagt ccactcttga 12900

gcatcgtaat gaggcataga agaatcggtg tgctgaagga aggtaacgaa aacaagccag 12960

tggttaacaa ggatccaagg acagaaccat gtgatgaaag taggccagaa tccgaaaacc 13020

ttgtaagcgg tgtaaacaga agtgagggta gcaaggattc caagatcaga aagaacgatg 13080

taccagtagt ccttcttatc gaaaacaggg ctagaaggcc agtagtgaga cttgaagaac 13140

ttagaaacac cagggtaagg ttgtccagta gcgttagtag caaggtaaag agaaagtcct 13200

ccaagctgtt ggaacaagag agcgaaaaca gagtagatag gagtttcctc agcgatatcg 13260

tgaaggctgg taacttggtg cttctctttg aattcctcgg cggtgtaagg aacgaaaacc 13320

atatctctgg tcatgtgtcc agtagcctta tggtgcttag catgagagaa cttccagctg 13380

aagtaaggaa ccataacaag agagtggaga acccatccaa cggtatcgtt aacccatccg 13440

tagttagaga aagcagaatg tccacactca tgtccaagga tccagattcc gaatccgaaa 13500

caagagatag agaacacgta agcagaccaa gcagcgaatc taaggaattc gttagggaga 13560

agagggatgt aggtaagtcc aacgtaagcg atagcagaga tagccacgat atctctcacc 13620

acgtaagaca tagacttcac gagagatctc tcgtaacagt gcttagggat agcgtcaagg 13680

atatccttga tggtgtaatc tggcaccttg aaaacgtttc cgaaggtatc gatagcggtc 13740

ttttgctgct tgaaagatgc aacgtttcca gaacgcctaa cggtcttagt agatccctca 13800

aggatctcag atccagacac ggtaacctta gacatggtat ggtaattgta aatgtaattg 13860

taatgttgtt tgttgtttgt tgttgttggt aattgttgta aaatttttgg tggtgattgg 13920

ttctttaagg tgtgagagtg agttgtgagt tgtgtggtgg gtttggtgag attggggatg 13980

gtgggtttat atagtggaga ctgaggaatg gggtcgtgag tgttaacttt gcatgggcta 14040

cacgtgggtt cttttgggct tacacgtagt attattcatg caaatgcagc caatacatat 14100

acggtatttt aataatgtgt gggaatacaa tatgccgagt attttactaa ttttggcaat 14160

gacaagtgta catttggatt atcttacttg gcctctcttg ctttaatttg gattattttt 14220

attctcttac cttggccgtt catattcaca tccctaaagg caagacagaa ttgaatggtg 14280

gccaaaaatt aaaacgatgg atatgaccta catagtgtag gatcaattaa cgtcgaagga 14340

aaatactgat tctctcaagc atacggacaa gggtaaataa catagtcacc agaacataat 14400

aaacaaaaag tgcagaagca agactaaaaa aattagctat ggacattcag gttcatattg 14460

gaaacatcat tatcctagtc ttgtgaccat ccttcctcct gctctagttg agaggccttg 14520

ggactaacga gaggtcagtt gggatagcag atccttatcc tggactagcc tttctggtgt 14580

ttcagagtct tcgtgccgcc gtctacatct atctccatta ggtctgaaga tgactcttca 14640

caccaacgac gtttaaggtc tctatcctac tcctagcttg caatacctgg cttgcaatac 14700

ctggagcatc gtgcacgatg attggatact gtggaggagg agtgtttgct gatttagagc 14760

tcccggttgg gtgatttgac ttcgatttca gtttaggctt gttgaaattt ttcaggttcc 14820

attgtgaagc ctttagagct tgagcttcct tccatgttaa tgccttgatc gaatactcct 14880

agagaaaagg gaagtcgatc tctgagtatt gaaatcgaag tgcacatttt ttttcaacgt 14940

gtccaatcaa tccacaaaca aagcagaaga caggtaatct ttcatactta tactgacaag 15000

taatagtctt accgtcatgc ataataacgt ctcgttcctt caagaggggt tttccgacat 15060

ccataacgac ccgaagcctc atgaaagcat tagggaagaa cttttggttc ttcttgtcat 15120

ggcctttata ggtgtcagcc gagctcgcca attcccgtcc gactggctcc gcaaaatatt 15180

cgaacggcaa gttatggact tgcaaccata actccacggt attgagcagg acctattgtg 15240

aagactcatc tcatggagct tcagaatgtg gttgtcagca aaccaatgac cgaaatccat 15300

cacatgacgg acgtccagtg ggtgagcgaa acgaaacagg aagcgcctat ctttcagagt 15360

cgtgagctcc acaccggatt ccggcaacta cgtgttgggc aggcttcgcc gtattagaga 15420

tatgttgagg cagacccatc tgtgccactc gtacaattac gagagttgtt ttttttgtga 15480

ttttcctagt ttctcgttga tggtgagctc atattctaca tcgtatggtc tctcaacgtc 15540

gtttcctgtc atctgatatc ccgtcatttg catccacgtg cgccgcctcc cgtgccaagt 15600
ccctaggtgt catgcacgcc aaattggtgg tggtgcgggc tgccctgtgc ttcttaccga 15660
tgggtggagg ttgagtttgg gggtctccgc ggcgatggta gtgggttgac ggtttggtgt 15720
gggttgacgg cattgatcaa tttacttctt gcttcaaatt ctttggcaga aaacaattca 15780
ttagattaga actggaaacc agagtgatga gacggattaa gtcagattcc aacagagtta 15840
catctcttaa gaaataatgt aaccccttta gactttatat atttgcaatt aaaaaaataa 15900
tttaactttt agactttata tatagtttta ataactaagt ttaaccactc tattatttat 15960
atcgaaacta tttgtatgtc tcccctctaa ataaacttgg tattgtgttt acagaaccta 16020
taatcaaata atcaatactc aactgaagtt tgtgcagtta attgaaggga ttaacggcca 16080
aaatgcacta gtattatcaa ccgaatagat tcacactaga tggccatttc catcaatatc 16140
atcgccgttc ttcttctgtc cacatatccc ctctgaaact tgagagacac ctgcacttca 16200
ttgtccttat tacgtgttac aaaatgaaac ccatgcatcc atgcaaactg aagaatggcg 16260
caagaaccct tcccctccat ttcttatgtg gcgaccatcc atttcaccat ctcccgctat 16320
aaaacacccc catcacttca cctagaacat catcactact tgcttatcca tccaaaagat 16380
acccactttt acaacaatta ccaacaacaa caaacaacaa acaacattac aattacattt 16440
acaattacca taccatgcca cctagcgctg ctaagcaaat gggagcttct actggtgttc 16500
atgctggtgt tactgactct tctgctttca ccagaaagga tgttgctgat agacctgatc 16560
tcaccatcgt tggagattct gtttacgatg ctaaggcttt cagatctgag catcctggtg 16620
gtgctcattt cgtttctttg ttcggaggaa gagatgctac tgaggctttc atggaatacc 16680
atagaagggc ttggcctaag tctagaatgt ctagattcca cgttggatct cttgcttcta 16740
ctgaggaacc tgttgctgct gatgagggat accttcaact ttgtgctagg atcgctaaga 16800
tggtgccttc tgtttcttct ggattcgctc ctgcttctta ctgggttaag gctggactta 16860
tccttggatc tgctatcgct cttgaggctt acatgcttta cgctggaaag agacttctcc 16920
cttctatcgt tcttggatgg cttttcgctc ttatcggtct taacatccag catgatgcta 16980
accatggtgc tttgtctaag tctgcttctg ttaaccttgc tcttggactt tgtcaggatt 17040
ggatcggagg atctatgatc ctttggcttc aagagcatgt tgttatgcac cacctccaca 17100
ctaacgatgt tgataaggat cctgatcaaa aggctcacgg tgctcttaga ctcaagccta 17160
ctgatgcttg gtcacctatg cattggcttc agcatcttta ccttttgcct ggtgagacta 17220
tgtacgcttt caagcttttg ttcctcgaca tctctgagct tgttatgtgg cgttgggagg 17280
gtgagcctat ctctaagctt gctggatacc tctttatgcc ttctttgctt ctcaagctta 17340
ccttctgggc tagattcgtt gctttgcctc tttaccttgc tccttctgtt catactgctg 17400

tgtgtatcgc tgctactgtt atgactggat ctttctacct cgctttcttc ttcttcatct 17460

cccacaactt cgagggtgtt gcttctgttg gacctgatgg atctatcact tctatgacta 17520

gaggtgctag cttccttaag agacaagctg agacttcttc taacgttgga ggacctcttc 17580

ttgctactct taacggtgga ctcaactacc aaattgagca tcacttgttc cctagagttc 17640

accatggatt ctaccctaga cttgctcctc ttgttaaggc tgagcttgag gctagaggaa 17700

tcgagtacaa gcactaccct actatctggt ctaaccttgc ttctaccctc agacatatgt 17760

acgctcttgg aagaaggcct agatctaagg ctgagtaatg acaagcttat gtgacgtgaa 17820

ataataacgg taaaatatat gtaataataa taataataaa gccacaaagt gagaatgagg 17880

ggaaggggaa atgtgtaatg agccagtagc cggtggtgct aattttgtat cgtattgtca 17940

ataaatcatg aattttgtgg tttttatgtg ttttttttaaa tcatgaattt taaattttat 18000

aaaataatct ccaatcggaa gaacaacatt ccatatccat gcatggatgt ttctttaccc 18060

aaatctagtt cttgagagga tgaagcatca ccgaacagtt ctgcaactat ccctcaaaag 18120

ctttaaaatg aacaacaagg aacagagcaa cgttccaaag atcccaaacg aaacatatta 18180

tctatactaa tactatatta ttaattacta ctgcccggaa tcacaatccc tgaatgattc 18240

ctattaacta caagccttgt tggcggcgga gaagtgatcg gcgcggcgag aagcagcgga 18300

ctcggagacg aggccttgga agatctgagt cgaacgggca gaatcagtat tttccttcga 18360

cgttaattga tcctacacta tgtaggtcat atccatcgtt ttaatttttg gccaccattc 18420

aattctgtct tgcctttagg gatgtgaata tgaacggcca aggtaagaga ataaaaataa 18480

tccaaattaa agcaagagag gccaagtaag ataatccaaa tgtacacttg tcattgccaa 18540

aattagtaaa atactcggca tattgtattc ccacacatta ttaaaatacc gtatatgtat 18600

tggctgcatt tgcatgaata atactacgtg taagcccaaa agaacccacg tgtagcccat 18660

gcaaagttaa cactcacgac cccattcctc agtctccact atataaaccc accatcccca 18720

atctcaccaa acccaccaca caactcacaa ctcactctca caccttaaag aaccaatcac 18780

caccaaaaat tttacaacaa ttaccaacaa caacaaacaa caaacaacat tacaattaca 18840

tttacaatta ccataccatg agcgctgtta ccgttactgg atctgatcct aagaacagag 18900

gatcttctag caacaccgag caagaggttc caaaagttgc tatcgatacc aacggaaacg 18960

tgttctctgt tcctgatttc accatcaagg acatccttgg agctatccct catgagtgtt 19020

acgagagaag attggctacc tctctctact acgtgttcag agatatcttc tgcatgctta 19080

ccaccggata ccttacccat aagatccttt accctctcct catctcttac acctctaaca 19140

gcatcatcaa gttcactttc tgggcccttt acacttacgt tcaaggactt ttcggaaccg 19200

gaatctgggt tctcgctcat gagtgtggac atcaagcttt ctctgattac ggaatcgtga 19260

acgatttcgt tggatggacc cttcactctt accttatggt tccttacttc agctggaagt 19320

actctcatgg aaagcaccat aaggctactg gacacatgac cagagatatg gttttcgttc 19380

ctgccaccaa agaggaattc aagaagtcta ggaacttctt cggtaacctc gctgagtact 19440

ctgaggattc tccacttaga acccttacg agcttcttgt tcaacaactt ggaggatgga 19500

tcgcttacct cttcgttaac gttacaggac aaccttaccc tgatgttcct tcttggaaat 19560

ggaaccactt ctggcttacc tctccacttt tcgagcaaag agatgctctc tacatcttcc 19620

tttctgatct tggaatcctc acccagggaa tcgttcttac tctttggtac aagaaattcg 19680

gaggatggtc cttttcatc aactggttcg ttccttacat ctgggttaac cactggctcg 19740

ttttcatcac attccttcag cacactgatc ctactatgcc tcattacaac gctgaggaat 19800

ggactttcgc taagggtgct gctgctacta tcgatagaaa gttcggattc atcggacctc 19860

acatcttcca tgatatcatc gagactcatg tgcttcacca ctactgttct aggatcccat 19920

tctacaacgc tagacctgct tctgaggcta tcaagaaagt tatgggaaag cactacaggt 19980

ctagcgacga gaacatgtgg aagtcacttt ggaagtcttt caggtcttgc caatacgttg 20040

acggtgataa cggtgttctc atgttccgta acatcaacaa ctgcggagtt ggagctgctg 20100

agaagtaatg aaggggtgat cgattatgag atcgtacaaa gacactgcta ggtgttaagg 20160

atggataata ataataataa tgagatgaat gtgttttaag ttagtgtaac agctgtaata 20220

aagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gaggctgatg 20280

aaatgttatg tatgtttctt ggtttttaaa ataaatgaaa gcacatgctc gtgtggttct 20340

atcgaattat tcggcggttc ctgtgggaaa aagtccagaa gggccgccgc agctactact 20400

acaaccaagg ccgtggagga gggcaacaga gccagcactt cgatagctgc tgcgatgatc 20460

ttaagcaatt gaggagcgag tgcacatgca ggggactgga gcgtgcaatc ggccagatga 20520

ggcaggacat ccagcagcag ggacagcagc aggaagttga gaggtggtcc catcaatcta 20580

aacaagtcgc tagggacctt ccgggacagt gcggcaccca gcctagccga tgccagctcc 20640

aggggcagca gcagtctgca tggttttgaa gtggtgatcg atgagatcgt ataaagacac 20700

tgctaggtgt taaggatggg ataataagat gtgttttaag tcattaaccg taataaaaag 20760

agagagaggc tgatggaatg ttatgtatgt atgtttcttg gtttttaaaa ttaaatggaa 20820

agcacatgct cgtgtgggtt ctatctcgat taaaaatccc aattatattt ggtctaattt 20880

agtttggtat tgagtaaaac aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagtttttat 20940

atatatgcct ttaagacttt ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg 21000

actcttctgg catgtaatat ttcgttaaat atgaagtgct ccatttttat taactttaaa 21060

taattggttg tacgatcact ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttgtt 21120

cttccatatt catatgtcaa aatctatcaa aattcttata tatctttttc gaatttgaag 21180

tgaaatttcg ataatttaaa attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt 21240
tttatactta attactaaat ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc 21300
aaacgactaa aataaataaa tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt 21360
taatagatca tatgtttgta aaaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca 21420
aaaatttgac aaagtaagat taaaataata ttcatctaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg 21480
ctgaaaaccc ggcaaaaccg aaccaatcca aaccgatata gttggtttgg tttgattttg 21540
atataaaccg aaccaactcg gtccatttgc acccctaatc ataatagctt taatatttca 21600
agatattatt aagttaacgt tgtcaatatc ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta 21660
tatggctgta atatgaattt aaaagcagct cgatgtggtg gtaatatgta atttacttga 21720
ttctaaaaaa atatcccaag tattaataat ttctgctagg aagaaggtta gctacgattt 21780
acagcaaagc cagaatacaa agaaccataa agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa 21840
caaatatttt taaaaaaata cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtgata tatttttgt 21900
tcttaaacaa gcatcccctc taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct 21960
cccttcgtta caaaaatttt ggactactat tgggaacttc ttctgaaaat agtcctgcag 22020
gctagtagat tggttggttg gtttccatgt accagaaggc ttaccctatt agttgaaagt 22080
tgaaactttg ttcgctactc aattcctagt tgtgtaaatg tatgtatatg taatgtgtat 22140
aaaacgtagt acttaaatga ctaggagtgg ttcttgagac cgatgagaga tgggagcaga 22200
actaaagatg atgacataat taagaacgaa tttgaaaggc tcttaggttt gaatcctatt 22260
cgagaatgtt tttgtcaaag atagtggcga ttttgaacca aagaaaacat ttaaaaaatc 22320
agtatccggt tacgttcatg caaatagaaa gtggtctagg atctgattgt aattttagac 22380
ttaaagagtc tcttaagatt caatcctggc tgtgtacaaa actacaaata atatatttta 22440
gactatttgg ccttaactaa acttccactc attatttact gaggttagag aatagacttg 22500
cgaataaaca cattcccgag aaatactcat gatcccataa ttagtcagag ggtatgccaa 22560
tcagatctaa gaacacacat tcgctcaaat tttaatgcac atgtaatcat agtttagcac 22620
aattcaaaaa taatgtagta ttaaagacag aaatttgtag actttttttt ggcgttaaaa 22680
gaagactaag tttatacgta cattttattt taagtggaaa accgaaattt tccatcgaaa 22740
tatatgaatt tagtatatat atttctgcaa tgtactattt tgctattttg gcaactttca 22800
gtggactact actttattac aatgtgtatg gatgcatgag tttgagtata cacatgtcta 22860
aatgcatgct ttgtaaaacg taacggacca caaaagagga tccatacaaa tacatctcat 22920
agcttcctcc attatttttcc gacacaaaca gagcatttta caacaattac caacaacaac 22980
aaacaacaaa caacattaca attacattta caattaccat accatggaat ttgctcaacc 23040
tctcgttgct atggctcaag agcagtacgc tgctatcgat gctgttgttg ctcctgctat 23100

cttctctgct accgactcta ttggatgggg actcaagcct atctcttctg ctactaagga 23160
tctcctctc gttgaatctc ctaccctct tatcctttct ctcctcgctt acttcgctat 23220
cgttggttct ggactcgttt accgtaaagt gttcctaga accgttaagg gacaggatcc 23280
tttccttctc aaggctctta tgctcgctca caacgttttc cttatcggac tcagccttta 23340
catgtgcctc aagctcgttt acgaggctta cgtgaacaag tactccttct ggggaaacgc 23400
ttacaaccct gctcaaaccg agatggctaa ggtgatctgg atcttctacg tgtccaagat 23460
ctacgagttc atggacacct tcatcatgct tctcaaggga aacgttaacc aggtttcctt 23520
cctccatgtt taccaccacg gatctatctc tggaatctgg tggatgatca cttatgctgc 23580
tccaggtgga gatgcttact tctctgctgc tctcaactct tgggttcatg tgtgcatgta 23640
cacctactac ttcatggctg ctgttcttcc taaggacgaa aagaccaaga gaaagtacct 23700
ttggtgggga agataccttа cccagatgca aatgttccag ttcttcatga accttctcca 23760
ggctgtttac ctcctctact cttcttctcc ttaccctaag ttcattgctc aactcctcgt 23820
tgtttacatg gttaccctcc tcatgctttt cggaaacttc tactacatga agcaccacgc 23880
ttctaagtga taagggccgc cgccatgtga cagatcgaag gaagaaagtg taataagacg 23940
actctcacta ctcgatcgct agtgattgtc attgttatat ataataatgt tatctttcac 24000
aacttatcgt aatgcatgtg aaactataac acattaatcc tacttgtcat atgataacac 24060
tctccccatt taaaactctt gtcaatttaa agatataaga ttctttaaat gattaaaaaa 24120
aatatattat aaattcaatc actcctacta ataaattatt aattattatt tattgattaa 24180
aaaaatactt atactaattt agtctgaata gaataattag attctagcct gcagggcggc 24240
cgcggatccc atggagtcaa agattcaaat agaggaccta acagaactcg ccgtaaagac 24300
tggcgaacag ttcatacaga gtctcttacg actcaatgac aagaagaaaa tcttcgtcaa 24360
catggtggag cacgacacac ttgtctactc caaaaatatc aaagatacag tctcagaaga 24420
ccaaagggca attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcc ggaaacctcc tcggattcca 24480
ttgcccagct atctgtcact ttattgtgaa gatagtggaa aaggaaggtg gctcctacaa 24540
atgccatcat tgcgataaag gaaaggccat cgttgaagat gcctctgccg acagtggtcc 24600
caaagatgga ccccccaccca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc 24660
ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca 24720
ctatccttcg caagacccct cctctatata aggaagttca tttcatttgg agagaacacg 24780
ggggactgaa ttaaatatga gcccctgagag gcgtcctgtt gaaatcagac ctgctactgc 24840
tgctgatatg gctgctgttt gtgatatcgt gaaccactac atcgagactt ctaccgttaa 24900
cttcagaact gagcctcaaa ctcctcaaga gtggatcgat gatcttgaga gactccaaga 24960

tagataccct tggcttgttg ctgaggttga gggtgttgtt gctggaatcg cttacgctgg 25020

accttggaag gctagaaacg cttacgattg gactgttgag tctaccgttt acgtttcaca 25080

cagacatcag agacttggac ttggatctac cctttacact caccttctca agtctatgga 25140

agctcaggga ttcaagtctg ttgttgctgt tatcggactc cctaacgatc cttctgttag 25200

acttcatgag gctcttggat acactgctag aggaactctt agagctgctg gatacaagca 25260

cggtggatgg catgatgttg gattctggca aagagatttc gagcttcctg ctcctcctag 25320

acctgttaga ccagttactc agatctgaat ttgcgtgatc gttcaaacat ttggcaataa 25380

agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg 25440

aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt 25500

tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc 25560

gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatca ctagtgatgt 25620

acggttaaaa ccaccccagt acattaaaaa cgtccgcaat gtgttattaa gttgtctaag 25680

cgtcaatttg tttacaccac aatatatcct gccaccagcc agccaacagc tccccgaccg 25740

gcagctcggc acaaaatcac cactcgatac aggcagccca tcagtcc 25787

<210> 4

<211> 22824

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de nucleótidos pGA7- mod_D

<400> 4

tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttca cgccctttta 60

aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120

tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180

tcacgacgtt gtaaaacggg cgcctcgatt aaaaatccca attatatttg gtctaattta 240

gtttggtatt gagtaaaaca aattcgaacc aaaccaaaat ataaatatat agtttttata 300

tatatgcctt taagactttt tatagaattt tctttaaaaa atatctagaa atatttgcga 360

ctcttctggc atgtaatatt tcgttaaata tgaagtgctc catttttatt aactttaaat 420

aattggttgt acgatcactt tcttatcaag tgttactaaa atgcgtcaat ctctttgttc 480

ttccatattc atatgtcaaa atctatcaaa attcttatat atctttttcg aatttgaagt 540

gaaatttcga taatttaaaa ttaaatagaa catatcatta tttaggtatc atattgattt 600

ttatacttaa ttactaaatt tggttaactt tgaaagtgta catcaacgaa aaattagtca 660

aacgactaaa ataaataaat atcatgtgtt attaagaaaa ttctcctata agaatatttt 720

aatagatcat atgtttgtaa aaaaaattaa tttttactaa cacatatatt tacttatcaa 780

aaatttgaca aagtaagatt aaaataatat tcatctaaca aaaaaaaaac cagaaaatgc 840

tgaaaacccg gcaaaaccga accaatccaa accgatatag ttggtttggt ttgattttga 900

tataaaccga accaactcgg tccatttgca cccctaatca taatagcttt aatatttcaa 960

gatattatta agttaacgtt gtcaatatcc tggaaatttt gcaaaatgaa tcaagcctat 1020

atggctgtaa tatgaattta aaagcagctc gatgtggtgg taatatgtaa tttacttgat 1080

tctaaaaaaa tatcccaagt attaataatt tctgctagga agaaggttag ctacgattta 1140

cagcaaagcc agaatacaaa gaaccataaa gtgattgaag ctcgaaatat acgaaggaac 1200

aaatattttt aaaaaaatac gcaatgactt ggaacaaaag aaagtgatat atttttgtt 1260

cttaaacaag catccccctct aaagaatggc agttttcctt tgcatgtaac tattatgctc 1320

ccttcgttac aaaaattttg gactactatt gggaacttct tctgaaaata gtggcgcccc 1380

gcggaaagct tgctagccaa ttggggccca acgttctcga gtttttctag aaggaaactg 1440

aaggcgggaa acgacaatct gctagtggat ctcccagtca cgacgttgta aaacgggcgc 1500

cccgcggaaa gcttgcggcc gcccgatcta gtaacataga tgacaccgcg cgcgataatt 1560

tatcctagtt tgcgcgctat attttgtttt ctatcgcgta ttaaatgtat aattgcggga 1620

ctctaatcat aaaaacccat ctcataaata acgtcatgca ttacatgtta attattacgt 1680

gcttaacgta attcaacaga aattatatga taatcatcgc aagaccggca acaggattca 1740

atcttaagaa actttattgc caaatgtttg aacgatcggc gcgcctcatt agtgagcctt 1800

ctcagccttt ccgttaacgt agtagtgctg tcccaccttа tcaaggttag agaaagtagc 1860

cttccaagca ccgtagtaag agagcaccтt gtagttgagt ccccacttct tagcgaaagg 1920

aacgaatctt ctgctaacct caggctgtct gaattgaggc atatcaggga agaggtggtg 1980

gataacctga cagttaaggt atcccataag ccagttcacg tatcctctag aaggatcgat 2040

atcaacggtg tgatcaacag cgtagttaac ccaagaaagg tgcttatcag atggaacaac 2100

agggaggtga gtatgagaag tagagaagtg agcgaaaagg tacatgtaag cgatccagtt 2160

tccgaaagtg aaccaccagt aagcaacagg ccaagagtat ccagtagcaa gcttgataac 2220

agcggttcta acaacatgag aaacgagcat ccaagaagcc tcttcgtagt tcttcttacg 2280

gagaacttgt ctagggtgga gaacgtagat ccagaaagct tgaacaagaa gtccagaggt 2340

aacaggaacg aaagtccaag cttgaagtct agcccaagct ctagagaatc ctctaggtct 2400

gttatcctca acagcagtgt tgaagaaagc cacagcagga gtggtatcaa gatccatatc 2460

gtgtctaacc ttttgagggg tagcatggtg cttgttatgc atctggttcc acatctcacc 2520

agaagtagaa agtccgaatc cacaagtcat agcctgaagt ctcttgtcca cgtaaacaga 2580

tccggtaaga gagttatgtc caccctcatg ttgaacccat ccacatctag ctccgaagaa 2640

agcaccgtaa acaacagaag caatgatagg gtatccagcg tacataagag cagttccaag 2700

agcgaatgta gcaagaagct cgagaagtct gtaagccaca tgggtgatag aaggcttgaa 2760

gaatccatct ctctcaagct cagcacgcca tctagcgaaa tcctcaagca taggagcatc 2820

ctcagactca gatctcttga tctcagcagg tctagaaggc aaagctctaa gcatcttcca 2880

agccttgaga gaacgcatgt ggaattcttt gaaagcctca gtagcatcag caccagtgtt 2940

agcaagcatg tagaagatca cagatccacc agggtgcttg aagttagtca catcgtactc 3000

aacgtcctca actctaaccc atctagtctc gaaagtagca gcaagctcat gaggctcaag 3060

agtcttaaga tcaacaggag cagtagaagc atccttagca tcaagagcct cagcagaaga 3120

tttagacctg gtaagtggag atctaggaga agatcttcca tcagtcttag gagggcacat 3180

ggtatggtaa ttgtaaatgt aattgtaatg ttgtttgttg tttgttgttg ttggtaattg 3240

ttgtaaaaga tcctcgtgta tgtttttaat cttgtttgta tcgatgagtt ttggtttgag 3300

taaagagtga agcggatgag ttaatttata ggctataaag gagatttgca tggcgatcac 3360

gtgtaataat gcatgcacgc atgtgattgt atgtgtgtgc tgtgagagag aagctcttag 3420

gtgtttgaag ggagtgacaa gtggcgaaga aaaacaattc tccgcggctg catgctatgt 3480

gtaacgtgta gctaatgttc tggcatggca tcttatgaac gattcttttt aaaaacaagg 3540

taaaaactta acttcataaa attaaaaaaa aaaacgttta ctaagttggt ttaaaagggg 3600

atgagactag tagattggtt ggttggtttc catgtaccag aaggcttacc ctattagttg 3660

aaagttgaaa ctttgttccc tactcaattc ctagttgtgt aaatgtatgt atatgtaatg 3720

tgtataaaac gtagtactta aatgactagg agtggttctt gagaccgatg agagatggga 3780

gcagaactaa agatgatgac ataattaaga acgaatttga aaggctctta ggtttgaatc 3840

ctattcgaga atgtttttgt caaagatagt ggcgattttg aaccaaagaa aacatttaaa 3900

aaatcagtat ccggttacgt tcatgcaaat agaaagtggt ctaggatctg attgtaattt 3960

tagacttaaa gagtctctta agattcaatc ctggctgtgt acaaaactac aaataatata 4020

ttttagacta tttggcctta actaaacttc cactcattat ttactgaggt tagagaatag 4080

acttgcgaat aaacacattc ccgagaaata ctcatgatcc cataattagt cagagggtat 4140

gccaatcaga tctaagaaca cacattccct caaattttaa tgcacatgta atcatagttt 4200

agcacaattc aaaaataatg tagtattaaa gacagaaatt tgtagacttt tttttggcgt 4260

taaaagaaga ctaagtttat acgtacattt tattttaagt ggaaaaccga aattttccat 4320

cgaaatatat gaatttagta tatatatttc tgcaatgtac tattttgcta ttttggcaac 4380

tttcagtgga ctactacttt attacaatgt gtatggatgc atgagtttga gtatacacat 4440

gtctaaatgc atgctttgta aaacgtaacg gaccacaaaa gaggatccat acaaatacat 4500

ctcatagctt cctccattat tttccgacac aaacagagca ttttacaaca attaccaaca 4560

acaacaaaca acaaacaaca ttacaattac atttacaatt accataccat ggaattcgcc 4620

cagcctcttg ttgctatggc tcaagagcaa tacgctgcta tcgatgctgt tgttgctcct 4680

gctatcttct ctgctactga ttctatcgga tggggactta agcctatctc ttctgctact 4740

aaggacttgc ctcttgttga gtctcctaca cctctcatcc tttctttgct tgcttacttc 4800

gctatcgttg gatctggact cgtttacaga aaggttttcc ctagaaccgt gaagggacaa 4860

gatccattcc ttttgaaggc tcttatgctt gctcacaacg tgttccttat cggactttct 4920

ctttacatgt gcctcaagct tgtgtacgag gcttacgtta acaagtactc tttctgggga 4980

aacgcttaca accctgctca aactgagatg gctaaggtta tctggatctt ctacgtgagc 5040

aagatctacg agttcatgga taccttcatc atgctcctca agggaaatgt taaccaggtt 5100

agcttccttc acgtttacca tcacggatct atctctggaa tctggtggat gattacttac 5160

gctgctcctg gtggtgatgc ttacttctct gctgctctta actcttgggt tcacgtgtgt 5220

atgtacacct actattttat ggctgccgtg cttcctaagg acgagaaaac taagagaaag 5280

tacctctggt ggggaagata ccttactcaa atgcagatgt tccagttctt catgaacctt 5340

ctccaggctg tttaccttct ctactcttca tctccttacc ctaagtttat cgctcagctc 5400

ctcgtggtgt acatggttac tcttctcatg cttttcggaa acttctacta catgaagcac 5460

cacgctagca agtgatgagg cgcgccgggc cgccgccatg tgacagatcg aaggaagaaa 5520

gtgtaataag acgactctca ctactcgatc gctagtgatt gtcattgtta tatataataa 5580

tgttatcttt cacaacttat cgtaatgcat gtgaaactat aacacattaa tcctacttgt 5640

catatgataa cactctcccc atttaaaact cttgtcaatt taaagatata agattcttta 5700

aatgattaaa aaaaatatat tataaattca atcactccta ctaataaatt attaattatt 5760

atttattgat taaaaaaata cttatactaa tttagtctga atagaataat tagattctag 5820

tctcatcccc ttttaaacca acttagtaaa cgttttttct tttaatttta tgaagttaag 5880

tttttacctt gtttttaaaa agaatcgttc ataagatgcc atgccagaac attagctaca 5940

cgttacacat agcatgcagc cgcggagaat tgtttttctt cgccacttgt cactcccttc 6000

aaacacctaa gagcttctct ctcacagcac acacatacaa tcacatgcgt gcatgcatta 6060

ttacacgtga tcgccatgca aatctccttt atagcctata aattaactca tccgcttcac 6120

tctttactca aaccaaaact catcgataca aacaagatta aaaacataca cgaggatctt 6180

ttacaacaat taccaacaac aacaaacaac aaacaacatt acaattacat ttacaattac 6240

cataccatgc ctccaaggga ctcttactct tatgctgctc ctccttctgc tcaacttcac 6300

gaagttgata ctcctcaaga gcacgacaag aaagagcttg ttatcggaga tagggcttac 6360

gatgttacca acttcgttaa gagacaccct ggtggaaaga tcattgctta ccaagttgga 6420

actgatgcta ccgatgctta caagcagttc catgttagat ctgctaaggc tgacaagatg 6480
cttaagtctc ttccttctcg tcctgttcac aagggatact ctccaagaag ggctgatctt 6540
atcgctgatt tccaagagtt caccaagcaa cttgaggctg agggaatgtt cgagccttct 6600
cttcctcatg ttgcttacag acttgctgag gttatcgcta tgcatgttgc tggtgctgct 6660
cttatctggc atggatacac tttcgctgga atcgctatgc ttggagttgt tcagggaaga 6720
tgtggatggc ttatgcatga gggtggacat tactctctca ctggaaacat tgctttcgac 6780
agagctatcc aagttgcttg ttacggactt ggatgtggaa tgtctggtgc ttggtggcgt 6840
aaccagcata acaagcacca tgctactcct caaaagcttc agcacgatgt tgatcttgat 6900
accattcctc tcgttgcttt ccatgagaga atcgctgcta aggttaagtc tcctgctatg 6960
aaggcttggc tttctatgca agctaagctt ttcgctcctg ttaccactct tcttgttgct 7020
cttggatggc agctttacct tcatcctaga cacatgctca ggactaagca ctacgatgag 7080
cttgctatgc tcggaatcag atacggactt gttggatacc ttgctgctaa ctacggtgct 7140
ggatacgttc tcgcttgtta ccttctttac gttcagcttg gagctatgta catcttctgc 7200
aacttcgctg tttctcatac tcaccctccc gttgttgagc ctaacgagca tgctacttgg 7260
gttgagtacg ctgctaacca cactactaac tgttctccat cttggtggtg tgattggtgg 7320
atgtcttacc ttaactacca gatcgagcac caccttacc cttctatgcc tcaattcaga 7380
caccctaaga tcgctcctag agttaagcag cttttcgaga agcacggact tcactacgat 7440
gttagaggat acttcgaggc tatggctgat actttcgcta accttgataa cgttgcccat 7500
gctcctgaga agaaaatgca gtaatgagat cgttcaaaca tttggcaata aagtttctta 7560
agattgaatc ctgttgccgg tcttgcgatg attatcatat aatttctgtt gaattacgtt 7620
aagcacgtaa taattaacat gtaatgcatg acgttattta tgagatgggt ttttatgatt 7680
agagtcccgc aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca aaatatagcg cgcaaactag 7740
gataaattat cgcgcgcggt gtcatctatg ttactagatc ggtcgattaa aaatcccaat 7800
tatatttggt ctaatttagt ttggtattga gtaaaacaaa ttcgaaccaa accaaaatat 7860
aaatatatag ttttttatata tatgccttta agacttttta tagaattttc tttaaaaaat 7920
atctagaaat atttgcgact cttctggcat gtaatatttc gttaaatatg aagtgctcca 7980
tttttattaa ctttaaataa ttggttgtac gatcactttc ttatcaagtg ttactaaaat 8040
gcgtcaatct ctttgttctt ccatattcat atgtcaaaat ctatcaaaat tcttatatat 8100
ctttttcgaa tttgaagtga aatttcgata atttaaaatt aaatagaaca tatcattatt 8160
taggtatcat attgatttttt atacttaatt actaaatttg gttaactttg aaagtgtaca 8220
tcaacgaaaa attagtcaaa cgactaaaat aaataaatat catgtgttat taagaaaatt 8280
ctcctataag aatattttaa tagatcatat gtttgtaaaa aaaattaatt tttactaaca 8340

catatattta cttatcaaaa atttgacaaa gtaagattaa aataatattc atctaacaaa 8400
aaaaaaacca gaaaatgctg aaaacccggc aaaaccgaac caatccaaac cgatatagtt 8460
ggtttggttt gattttgata taaaccgaac caactcggtc catttgcacc cctaatcata 8520
atagctttaa tatttcaaga tattattaag ttaacgttgt caatatcctg gaaattttgc 8580
aaaatgaatc aagcctatat ggctgtaata tgaatttaaa agcagctcga tgtggtggta 8640
atatgtaatt tacttgattc taaaaaaata tcccaagtat taataatttc tgctaggaag 8700
aaggttagct acgatttaca gcaaagccag aatacaaaga accataaagt gattgaagct 8760
cgaaatatac gaaggaacaa atatttttaa aaaaatacgc aatgacttgg aacaaaagaa 8820
agtgatatat tttttgttct taaacaagca tcccctctaa agaatggcag ttttcctttg 8880
catgtaacta ttatgctccc ttcgttacaa aaattttgga ctactattgg gaacttcttc 8940
tgaaaatagt gatagaaccc acacgagcat gtgctttcca tttaatttta aaaaccaaga 9000
aacatacata cataacattc catcagcctc tctctctttt tattacggtt aatgacttaa 9060
aacacatctt attatcccat ccttaacacc tagcagtgtc tttatacgat ctcatcgatc 9120
accacttcaa aaccatgcag actgctgctg cccctggagc tggcatcggc taggctgggt 9180
gccgcactgt cccggaaggt ccctagcgac ttgtttagat tgatgggacc acctctcaac 9240
ttcctgctgc tgtccctgct gctggatgtc ctgcctcatc tggccgattg cacgctccag 9300
tcccctgcat gtgcactcgc tcctcaattg cttaagatca tcgcagcagc tatcgaagtg 9360
ctggctctgt tgccctcctc cacggccttg gttgtagtag tagctgccgc cgcccttctg 9420
gacttttttcc cacaggaacc gccgaataat tcgatagaac cacacgagca tgtgctttca 9480
tttattttaa aaaccaagaa acatacataa catttcatca gcctctctct ctctctctct 9540
ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctttatta cagctgttac actaacttaa 9600
aacacattca tctcattatt attattatta tccatcctta acacctagca gtgtctttgt 9660
acgatctcat aatcgatcac cccttcatca ggtatcctta ggcttcactc caacgttgtt 9720
gcagttacgg aacatgtaca caccatcatg gttctcaacg aactggcaag atctccaagt 9780
tttccaaagg ctaacccaca tgttctcatc ggtgtgtctg tagtgctctc ccataacttt 9840
cttgatgcac tcggtagctt ctctagcatg gtagaatggg atccttgaaa cgtagtgatg 9900
gagcacatga gtctcgatga tgtcatggaa gatgattccg aggattccga actctctatc 9960
gatagtagca gcagcaccct tagcgaaagt ccactcttga gcatcgtaat gaggcataga 10020
agaatcggtg tgctgaagga aggtaacgaa aacaagccag tggttaacaa ggatccaagg 10080
acagaaccat gtgatgaaag taggccagaa tccgaaaacc ttgtaagcgg tgtaaacaga 10140
agtgagggta gcaaggattc caagatcaga aagaacgatg taccagtagt ccttcttatc 10200

gaaaacaggg ctagaaggcc agtagtgaga cttgaagaac ttagaaacac cagggtaagg 10260

ttgtccagta gcgttagtag caaggtaaag agaaagtcct ccaagctgtt ggaacaagag 10320

agcgaaaaca gagtagatag gagtttcctc agcgatatcg tgaaggctgg taacttggtg 10380

cttctctttg aattcctcgg cggtgtaagg aacgaaaacc atatctctgg tcatgtgtcc 10440

agtagcctta tggtgcttag catgagagaa cttccagctg aagtaaggaa ccataacaag 10500

agagtggaga acccatccaa cggtatcgtt aacccatccg tagttagaga aagcagaatg 10560

tccacactca tgtccaagga tccagattcc gaatccgaaa caagagatag agaacacgta 10620

agcagaccaa gcagcgaatc taaggaattc gttagggaga agagggatgt aggtaagtcc 10680

aacgtaagcg atagcagaga tagccacgat atctctcacc acgtaagaca tagacttcac 10740

gagagatctc tcgtaacagt gcttagggat agcgtcaagg atatccttga tggtgtaatc 10800

tggcaccttg aaaacgtttc cgaaggtatc gatagcggtc ttttgctgct tgaaagatgc 10860

aacgtttcca gaacgcctaa cggtcttagt agatccctca aggatctcag atccagacac 10920

ggtaaccttа gacatggtat ggtaattgta aatgtaattg taatgttgtt tgttgtttgt 10980

tgttgttggt aattgttgta aaatttttgg tggtgattgg ttctttaagg tgtgagagtg 11040

agttgtgagt tgtgtggtgg gtttggtgag attggggatg gtgggtttat atagtggaga 11100

ctgaggaatg gggtcgtgag tgttaacttt gcatgggcta cacgtgggtt cttttgggct 11160

tacacgtagt attattcatg caaatgcagc caatacatat acggtatttt aataatgtgt 11220

gggaatacaa tatgccgagt attttactaa ttttggcaat gacaagtgta catttggatt 11280

atcttacttg gcctctcttg ctttaatttg gattattttt attctcttac cttggccgtt 11340

catattcaca tccctaaagg caagacagaa ttgaatggtg gccaaaaatt aaaacgatgg 11400

atatgaccta catagtgtag gatcaattaa cgtcgaagga aaatactgat tctctcaagc 11460

atacggacaa gggtaaataa catagtcacc agaacataat aaacaaaaag tgcagaagca 11520

agactaaaaa aattagctat ggacattcag gttcatattg gaaacatcat tatcctagtc 11580

ttgtgaccat ccttcctcct gctctagttg agaggccttg ggactaacga gaggtcagtt 11640

gggatagcag atccttatcc tggactagcc tttctggtgt ttcagagtct tcgtgccgcc 11700

gtctacatct atctccatta ggtctgaaga tgactcttca caccaacgac gtttaaggtc 11760

tctatcctac tcctagcttg caatacctgg cttgcaatac ctggagcatc gtgcacgatg 11820

attggatact gtggaggagg agtgtttgct gatttagagc tcccggttgg gtgatttgac 11880

ttcgatttca gtttaggctt gttgaaattt ttcaggttcc attgtgaagc ctttagagct 11940

tgagcttcct tccatgttaa tgccttgatc gaatactcct agagaaaagg gaagtcgatc 12000

tctgagtatt gaaatcgaag tgcacatttt ttttcaacgt gtccaatcaa tccacaaaca 12060

aagcagaaga caggtaatct ttcatactta tactgacaag taatagtctt accgtcatgc 12120

ataataacgt ctcgttcctt caagaggggt tttccgacat ccataacgac ccgaagcctc 12180

atgaaagcat tagggaagaa cttttggttc ttcttgtcat ggcctttata ggtgtcagcc 12240

gagctcgcca attcccgtcc gactggctcc gcaaaatatt cgaacggcaa gttatggact 12300

tgcaaccata actccacggt attgagcagg acctattgtg aagactcatc tcatggagct 12360

tcagaatgtg gttgtcagca aaccaatgac cgaaatccat cacatgacgg acgtccagtg 12420

ggtgagcgaa acgaaacagg aagcgcctat ctttcagagt cgtgagctcc acaccggatt 12480

ccggcaacta cgtgttgggc aggcttcgcc gtattagaga tatgttgagg cagacccatc 12540

tgtgccactc gtacaattac gagagttgtt ttttttgtga ttttcctagt ttctcgttga 12600

tggtgagctc atattctaca tcgtatggtc tctcaacgtc gtttcctgtc atctgatatc 12660

ccgtcatttg catccacgtg cgccgcctcc cgtgccaagt ccctaggtgt catgcacgcc 12720

aaattggtgg tggtgcgggc tgccctgtgc ttcttaccga tgggtggagg ttgagtttgg 12780

gggtctccgc ggcgatggta gtgggttgac ggtttggtgt gggttgacgg cattgatcaa 12840

tttacttctt gcttcaaatt ctttggcaga aaacaattca ttagattaga actggaaacc 12900

agagtgatga gacggattaa gtcagattcc aacagagtta catctcttaa gaaataatgt 12960

aaccccttta gactttatat atttgcaatt aaaaaaataa tttaactttt agactttata 13020

tatagtttta ataactaagt ttaaccactc tattatttat atcgaaacta tttgtatgtc 13080

tccccctctaa ataaacttgg tattgtgttt acagaaccta taatcaaata atcaatactc 13140

aactgaagtt tgtgcagtta attgaaggga ttaacggcca aaatgcacta gtattatcaa 13200

ccgaatagat tcacactaga tggccatttc catcaatatc atcgccgttc ttcttctgtc 13260

cacatatccc ctctgaaact tgagagacac ctgcacttca ttgtccttat tacgtgttac 13320

aaaatgaaac ccatgcatcc atgcaaactg aagaatggcg caagaaccct tcccctccat 13380

ttcttatgtg gcgaccatcc atttcaccat ctcccgctat aaaacacccc catcacttca 13440

cctagaacat catcactact tgcttatcca tccaaaagat acccactttt acaacaatta 13500

ccaacaacaa caaacaacaa acaacattac aattacattt acaattacca taccatgcca 13560

cctagcgctg ctaagcaaat gggagcttct actggtgttc atgctggtgt tactgactct 13620

tctgctttca ccagaaagga tgttgctgat agacctgatc tcaccatcgt tggagattct 13680

gtttacgatg ctaaggcttt cagatctgag catcctggtg gtgctcattt cgtttctttg 13740

ttcggaggaa gagatgctac tgaggctttc atggaatacc atagaagggc ttggcctaag 13800

tctagaatgt ctagattcca cgttggatct cttgcttcta ctgaggaacc tgttgctgct 13860

gatgagggat accttcaact ttgtgctagg atcgctaaga tggtgccttc tgtttcttct 13920

ggattcgctc ctgcttctta ctgggttaag gctggactta tccttggatc tgctatcgct 13980

cttgaggctt acatgcttta cgctggaaag agacttctcc cttctatcgt tcttggatgg 14040

cttttcgctc ttatcggtct taacatccag catgatgcta accatggtgc tttgtctaag 14100

tctgcttctg ttaaccttgc tcttggactt tgtcaggatt ggatcggagg atctatgatc 14160

ctttggcttc aagagcatgt tgttatgcac cacctccaca ctaacgatgt tgataaggat 14220

cctgatcaaa aggctcacgg tgctcttaga ctcaagccta ctgatgcttg gtcacctatg 14280

cattggcttc agcatcttta ccttttgcct ggtgagacta tgtacgcttt caagcttttg 14340

ttcctcgaca tctctgagct tgttatgtgg cgttgggagg gtgagcctat ctctaagctt 14400

gctggatacc tctttatgcc ttctttgctt ctcaagctta ccttctgggc tagattcgtt 14460

gctttgcctc tttaccttgc tccttctgtt catactgctg tgtgtatcgc tgctactgtt 14520

atgactggat ctttctacct cgctttcttc ttcttcatct cccacaactt cgagggtgtt 14580

gcttctgttg gacctgatgg atctatcact tctatgacta gaggtgctag cttccttaag 14640

agacaagctg agacttcttc taacgttgga ggacctcttc ttgctactct taacggtgga 14700

ctcaactacc aaattgagca tcacttgttc cctagagttc accatggatt ctaccctaga 14760

cttgctcctc ttgttaaggc tgagcttgag gctagaggaa tcgagtacaa gcactaccct 14820

actatctggt ctaaccttgc ttctaccctc agacatatgt acgctcttgg aagaaggcct 14880

agatctaagg ctgagtaatg acaagcttat gtgacgtgaa ataataacgg taaaatatat 14940

gtaataataa taataataaa gccacaaagt gagaatgagg ggaaggggaa atgtgtaatg 15000

agccagtagc cggtggtgct aattttgtat cgtattgtca ataaatcatg aattttgtgg 15060

tttttatgtg ttttttaaa tcatgaattt taaattttat aaaataatct ccaatcggaa 15120

gaacaacatt ccatatccat gcatggatgt ttctttaccc aaatctagtt cttgagagga 15180

tgaagcatca ccgaacagtt ctgcaactat ccctcaaaag ctttaaaatg aacaacaagg 15240

aacagagcaa cgttccaaag atcccaaacg aaacatatta tctatactaa tactatatta 15300

ttaattacta ctgcccggaa tcacaatccc tgaatgattc ctattaacta caagccttgt 15360

tggcggcgga gaagtgatcg gcgcggcgag aagcagcgga ctcggagacg aggccttgga 15420

agatctgagt cgaacgggca gaatcagtat tttccttcga cgttaattga tcctacacta 15480

tgtaggtcat atccatcgtt ttaatttttg gccaccattc aattctgtct tgcctttagg 15540

gatgtgaata tgaacggcca aggtaagaga ataaaaataa tccaaattaa agcaagagag 15600

gccaagtaag ataatccaaa tgtacacttg tcattgccaa aattagtaaa atactcggca 15660

tattgtattc ccacacatta ttaaaatacc gtatatgtat tggctgcatt tgcatgaata 15720

atactacgtg taagcccaaa agaacccacg tgtagcccat gcaaagttaa cactcacgac 15780

cccattcctc agtctccact atataaaccc accatcccca atctcaccaa acccaccaca 15840

caactcacaa ctcactctca caccttaaag aaccaatcac caccaaaaat tttacaacaa 15900

ttaccaacaa caacaaacaa caaacaacat tacaattaca tttacaatta ccataccatg 15960

agcgctgtta ccgttactgg atctgatcct aagaacagag gatcttctag caacaccgag 16020

caagaggttc caaaagttgc tatcgatacc aacggaaacg tgttctctgt tcctgatttc 16080

accatcaagg acatccttgg agctatccct catgagtgtt acgagagaag attggctacc 16140

tctctctact acgtgttcag agatatcttc tgcatgctta ccaccggata ccttacccat 16200

aagatccttt accctctcct catctcttac acctctaaca gcatcatcaa gttcactttc 16260

tgggcccttt acacttacgt tcaaggactt ttcggaaccg gaatctgggt tctcgctcat 16320

gagtgtggac atcaagcttt ctctgattac ggaatcgtga acgatttcgt tggatggacc 16380

cttcactctt accttatggt tccttacttc agctggaagt actctcatgg aaagcaccat 16440

aaggctactg gacacatgac cagagatatg gttttcgttc ctgccaccaa agaggaattc 16500

aagaagtcta ggaacttctt cggtaacctc gctgagtact ctgaggattc tccacttaga 16560

acccctttacg agcttcttgt tcaacaactt ggaggatgga tcgcttacct cttcgttaac 16620

gttacaggac aaccttaccc tgatgttcct tcttggaaat ggaaccactt ctggcttacc 16680

tctccacttt tcgagcaaag agatgctctc tacatcttcc tttctgatct tggaatcctc 16740

acccagggaa tcgttcttac tctttggtac aagaaattcg gaggatggtc cctttttcatc 16800

aactggttcg ttccttacat ctgggttaac cactggctcg ttttcatcac attccttcag 16860

cacactgatc ctactatgcc tcattacaac gctgaggaat ggactttcgc taagggtgct 16920

gctgctacta tcgatagaaa gttcggattc atcggacctc acatcttcca tgatatcatc 16980

gagactcatg tgcttcacca ctactgttct aggatcccat tctacaacgc tagacctgct 17040

tctgaggcta tcaagaaagt tatgggaaag cactacaggt ctagcgacga gaacatgtgg 17100

aagtcacttt ggaagtcttt caggtcttgc caatacgttg acggtgataa cggtgttctc 17160

atgttccgta acatcaacaa ctgcggagtt ggagctgctg agaagtaatg aaggggtgat 17220

cgattatgag atcgtacaaa gacactgcta ggtgttaagg atggataata ataataataa 17280

tgagatgaat gtgttttaag ttagtgtaac agctgtaata aagagagaga gagagagaga 17340

gagagagaga gagagagaga gagagagaga gaggctgatg aaatgttatg tatgtttctt 17400

ggtttttaaa ataaatgaaa gcacatgctc gtgtggttct atcgaattat tcggcggttc 17460

ctgtgggaaa aagtccagaa gggccgccgc agctactact acaaccaagg ccgtggagga 17520

gggcaacaga gccagcactt cgatagctgc tgcgatgatc ttaagcaatt gaggagcgag 17580

tgcacatgca ggggactgga gcgtgcaatc ggccagatga ggcaggacat ccagcagcag 17640

ggacagcagc aggaagttga gaggtggtcc catcaatcta aacaagtcgc tagggacctt 17700

ccgggacagt gcggcaccca gcctagccga tgccagctcc aggggcagca gcagtctgca 17760

tggttttgaa gtggtgatcg atgagatcgt ataaagacac tgctaggtgt taaggatggg 17820

ataataagat gtgttttaag tcattaaccg taataaaaag agagagaggc tgatggaatg 17880

ttatgtatgt atgtttcttg gtttttaaaa ttaaatggaa agcacatgct cgtgtgggtt 17940

ctatctcgat taaaaatccc aattatattt ggtctaattt agtttggtat tgagtaaaac 18000

aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagtttttat atatatgcct ttaagacttt 18060

ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg actcttctgg catgtaatat 18120

ttcgttaaat atgaagtgct ccatttttat taactttaaa taattggttg tacgatcact 18180

ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttgtt cttccatatt catatgtcaa 18240

aatctatcaa aattcttata tatcttttte gaatttgaag tgaaatttcg ataatttaaa 18300

attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt tttatactta attactaaat 18360

ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc aaacgactaa aataaataaa 18420

tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt taatagatca tatgtttgta 18480

aaaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca aaaatttgac aaagtaagat 18540

taaaataata ttcatctaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg ctgaaaaccc ggcaaaaccg 18600

aaccaatcca aaccgatata gttggtttgg tttgattttg atataaaccg aaccaactcg 18660

gtccatttgc accctaatc ataatagctt taatatttca agatattatt aagttaacgt 18720

tgtcaatatc ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta tatggctgta atatgaattt 18780

aaaagcagct cgatgtggtg gtaatatgta atttacttga ttctaaaaaa atatcccaag 18840

tattaataat ttctgctagg aagaaggtta gctacgattt acagcaaagc cagaatacaa 18900

agaaccataa agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa caaatatttt taaaaaaata 18960

cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtgata tatttttttgt tcttaaacaa gcatcccctc 19020

taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgtta caaaaatttt 19080

ggactactat tgggaacttc ttctgaaaat agtcctgcag gctagtagat tggttggttg 19140

gtttccatgt accagaaggc ttaccctatt agttgaaagt tgaaactttg ttccctactc 19200

aattcctagt tgtgtaaatg tatgtatatg taatgtgtat aaaacgtagt acttaaatga 19260

ctaggagtgg ttcttgagac cgatgagaga tgggagcaga actaaagatg atgacataat 19320

taagaacgaa tttgaaaggc tcttaggttt gaatcctatt cgagaatgtt tttgtcaaag 19380

atagtggcga ttttgaacca aagaaaacat ttaaaaaatc agtatccggt tacgttcatg 19440

caaatagaaa gtggtctagg atctgattgt aattttagac ttaaagagtc tcttaagatt 19500

caatcctggc tgtgtacaaa actacaaata atatatttta gactatttgg ccttaactaa 19560

acttccactc attatttact gaggttagag aatagacttg cgaataaaca cattcccgag 19620

aaatactcat gatcccataa ttagtcagag ggtatgccaa tcagatctaa gaacacacat 19680

tccctcaaat tttaatgcac atgtaatcat agtttagcac aattcaaaaa taatgtagta 19740

ttaaagacag aaatttgtag actttttttt ggcgttaaaa gaagactaag tttatacgta 19800

cattttattt taagtggaaa accgaaattt tccatcgaaa tatatgaatt tagtatatat 19860

atttctgcaa tgtactattt tgctattttg gcaactttca gtggactact actttattac 19920

aatgtgtatg gatgcatgag tttgagtata cacatgtcta aatgcatgct ttgtaaaacg 19980

taacggacca caaaagagga tccatacaaa tacatctcat agcttcctcc attattttcc 20040

gacacaaaca gagcatttta caacaattac caacaacaac aaacaacaaa caacattaca 20100

attacattta caattaccat accatggcct ctatcgctat ccctgctgct cttgctggaa 20160

ctcttggata cgttacctac aatgtggcta accctgatat cccagcttct gagaaagttc 20220

ctgcttactt catgcaggtt gagtactggg gacctactat cggaactatt ggatacctcc 20280

tcttcatcta cttcggaaag cgtatcatgc agaacagatc tcaacctttc ggactcaaga 20340

acgctatgct cgtttacaac ttctaccaga ccttcttcaa cagctactgc atctaccttt 20400

tcgttacttc tcatagggct cagggactta aggtttgggg aaacatccct gatatgactg 20460

ctaactcttg gggaatctct caggttatct ggcttcacta caacaacaag tacgttgagc 20520

ttctcgacac cttcttcatg gtgatgagga agaagttcga ccagctttct ttccttcaca 20580

tctaccacca cactcttctc atctggtcat ggttcgttgt tatgaagctt gagcctgttg 20640

gagattgcta cttcggatct tctgttaaca ccttcgtgca cgtgatcatg tactcttact 20700

acggacttgc tgctcttgga gttaactgtt tctggaagaa gtacatcacc cagatccaga 20760

tgcttcagtt ctgtatctgt gcttctcact ctatctacac cgcttacgtt cagaataccg 20820

ctttctggct tccttacctt caactctggg ttatggtgaa catgttcgtt ctcttcgcca 20880

acttctaccg taagaggtac aagtctaagg gtgctaagaa gcagtgataa gggccgccgc 20940

catgtgacag atcgaaggaa gaaagtgtaa taagacgact ctcactactc gatcgctagt 21000

gattgtcatt gttatatata ataatgttat ctttcacaac ttatcgtaat gcatgtgaaa 21060

ctataacaca ttaatcctac ttgtcatatg ataacactct ccccatttaa aactcttgtc 21120

aatttaaaga tataagattc tttaaatgat taaaaaaaat atattataaa ttcaatcact 21180

cctactaata aattattaat tattatttat tgattaaaaa aatacttata ctaatttagt 21240

ctgaatagaa taattagatt ctagcctgca gggcggccgc ggatcccatg gagtcaaaga 21300

ttcaaataga ggacctaaca gaactcgccg taaagactgg cgaacagttc atacagagtc 21360

tcttacgact caatgacaag aagaaaatct tcgtcaacat ggtggagcac gacacacttg 21420

tctactccaa aaatatcaaa gatacagtct cagaagacca aagggcaatt gagacttttc 21480

aacaaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgtcacttta 21540

ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa 21600

aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa agatggaccc ccacccacga 21660

ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg 21720

atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa gacccttcct 21780

ctatataagg aagttcattt catttggaga gaacacgggg gactgaatta aatatgagcc 21840

ctgagaggcg tcctgttgaa atcagacctg ctactgctgc tgatatggct gctgtttgtg 21900

atatcgtgaa ccactacatc gagacttcta ccgttaactt cagaactgag cctcaaactc 21960

ctcaagagtg gatcgatgat cttgagagac tccaagatag ataccccttgg cttgttgctg 22020

aggttgaggg tgttgttgct ggaatcgctt acgctggacc ttggaaggct agaaacgctt 22080

acgattggac tgttgagtct accgtttacg tttcacacag acatcagaga cttggacttg 22140

gatctaccct ttacactcac cttctcaagt ctatggaagc tcagggattc aagtctgttg 22200

ttgctgttat cggactccct aacgatcctt ctgttagact tcatgaggct cttggataca 22260

ctgctagagg aactcttaga gctgctggat acaagcacgg tggatggcat gatgttggat 22320

tctggcaaag agatttcgag cttcctgctc ctcctagacc tgttagacca gttactcaga 22380

tctgaatttg cgtgatcgtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt 22440

tgccggtctt gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat 22500

taacatgtaa tgcatgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcaatt 22560

atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg 22620

cgcggtgtca tctatgttac tagatcacta gtgatgtacg gttaaaacca ccccagtaca 22680

ttaaaaacgt ccgcaatgtg ttattaagtt gtctaagcgt caatttgttt acaccacaat 22740

atatcctgcc accagccagc caacagctcc ccgaccggca gctcggcaca aaatcaccac 22800

tcgatacagg cagcccatca gtcc 22824

<210> 5

<211> 24809

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de nucleótidos de pga7- mod_e

<400> 5

tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttca cgccctttta 60

aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120

tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180

tcacgacgtt gtaaaacggg cgcctcgatt aaaaatccca attatatttg gtctaattta 240

gtttggtatt gagtaaaaca aattcgaacc aaaccaaaat ataaatatat agtttttata 300

tatatgcctt taagactttt tatagaattt tctttaaaaa atatctagaa atatttgcga 360

ctcttctggc atgtaatatt tcgttaaata tgaagtgctc catttttatt aactttaaat 420

aattggttgt acgatcactt tcttatcaag tgttactaaa atgcgtcaat ctctttgttc 480

ttccatattc atatgtcaaa atctatcaaa attcttatat atcttttttcg aatttgaagt 540

gaaatttcga taatttaaaa ttaaatagaa catatcatta tttaggtatc atattgattt 600

ttatacttaa ttactaaatt tggttaactt tgaaagtgta catcaacgaa aaattagtca 660

aacgactaaa ataaataaat atcatgtgtt attaagaaaa ttctcctata agaatatttt 720

aatagatcat atgtttgtaa aaaaaattaa tttttactaa cacatatatt tacttatcaa 780

aaatttgaca aagtaagatt aaaataatat tcatctaaca aaaaaaaaac cagaaaatgc 840

tgaaaacccg gcaaaaccga accaatccaa accgatatag ttggtttggt ttgattttga 900

tataaaccga accaactcgg tccatttgca cccctaatca taatagcttt aatatttcaa 960

gatattatta agttaacgtt gtcaatatcc tggaaatttt gcaaaatgaa tcaagcctat 1020

atggctgtaa tatgaattta aaagcagctc gatgtggtgg taatatgtaa tttacttgat 1080

tctaaaaaaa tatcccaagt attaataatt tctgctagga agaaggttag ctacgattta 1140

cagcaaagcc agaatacaaa gaaccataaa gtgattgaag ctcgaaatat acgaaggaac 1200

aaatattttt aaaaaaatac gcaatgactt ggaacaaaag aaagtgatat atttttgttt 1260

cttaaacaag catcccctct aaagaatggc agttttcctt tgcatgtaac tattatgctc 1320

ccttcgttac aaaaattttg gactactatt gggaacttct tctgaaaata gtggcgcccc 1380

gcggaaagct tgctagccaa ttggggccca acgttctcga gtttttctag aaggaaactg 1440

aaggcgggaa acgacaatct gctagtggat ctcccagtca cgacgttgta aaacgggcgc 1500

cccgcggaaa gcttgcggcc gcggtaccgc ccgttcgact cagatcttcc aaggcctcgt 1560

ctccgagtcc gctgcttctc gccgcgccga tcacttctcc gccgccaaca aggcttgtag 1620

ttaataggaa tcattcaggg attgtgattc cgggcagtag taattaataa tatagtatta 1680

gtatagataa tatgtttcgt ttgggatctt tggaacgttg ctctgttcct tgttgttcat 1740

tttaaagctt ttgagggata gttgcagaac tgttcggtga tgcttcatcc tctcaagaac 1800

tagatttggg taaagaaaca tccatgcatg gatatggaat gttgttcttc cgattggaga 1860

ttattttata aaatttaaaa ttcatgattt aaaaaaacac ataaaaacca caaaattcat 1920

gatttattga caatacgata caaaattagc accaccggct actggctcat tacacatttc 1980

cccttccccc cattctcact ttgtggcttt attattatta ttattacata tattttaccg 2040

ttattatttc acgtcacata agcttgttaa ttaatcatta gtgagccttc tcagcctttc 2100

cgttaacgta gtagtgctgt cccaccttat caaggttaga gaaagtagcc ttccaagcac 2160

cgtagtaaga gagcaccttg tagttgagtc cccacttctt agcgaaagga acgaatcttc 2220

tgctaacctc aggctgtctg aattgaggca tatcagggaa gaggtggtgg ataacctgac 2280

agttaaggta tcccataagc cagttcacgt atcctctaga aggatcgata tcaacggtgt 2340

gatcaacagc gtagttaacc caagaaaggt gcttatcaga tggaacaaca gggaggtgag 2400

tatgagaagt agagaagtga gcgaaaaggt acatgtaagc gatccagttt ccgaaagtga 2460

accaccagta agcaacaggc caagagtatc cagtagcaag cttgataaca gcggttctaa 2520

caacatgaga aacgagcatc caagaagcct cttcgtagtt cttcttacgg agaacttgtc 2580

tagggtggag aacgtagatc cagaaagctt gaacaagaag tccagaggta acaggaacga 2640

aagtccaagc ttgaagtcta gcccaagctc tagagaatcc tctaggtctg ttatcctcaa 2700

cagcagtgtt gaagaaagcc acagcaggag tggtatcaag atccatatcg tgtctaacct 2760

tttgaggggt agcatggtgc ttgttatgca tctggttcca catctcacca gaagtagaaa 2820

gtccgaatcc acaagtcata gcctgaagtc tcttgtccac gtaaacagat ccggtaagag 2880

agttatgtcc accctcatgt tgaacccatc cacatctagc tccgaagaaa gcaccgtaaa 2940

caacagaagc aatgataggg tatccagcgt acataagagc agttccaaga gcgaatgtag 3000

caagaagctc gagaagtctg taagccacat gggtgataga aggcttgaag aatccatctc 3060

tctcaagctc agcacgccat ctagcgaaat cctcaagcat aggagcatcc tcagactcag 3120

atctcttgat ctcagcaggt ctagaaggca aagctctaag catcttccaa gccttgagag 3180

aacgcatgtg gaattctttg aaagcctcag tagcatcagc accagtgtta gcaagcatgt 3240

agaagatcac agatccacca gggtgcttga agttagtcac atcgtactca acgtcctcaa 3300

ctctaaccca tctagtctcg aaagtagcag caagctcatg aggctcaaga gtcttaagat 3360

caacaggagc agtagaagca tccttagcat caagagcctc agcagaagat ttagacctgg 3420

taagtggaga tctaggagaa gatcttccat cagtcttagg agggcacatg gtatggtaat 3480

tgtaaatgta attgtaatgt tgtttgttgt ttgttgttgt tggtaattgt tgtaaaatta 3540

attaagtggg tatcttttgg atggataagc aagtagtgat gatgttctag gtgaagtgat 3600

gggggtgttt tatagcggga gatggtgaaa tggatggtcg ccacataaga aatggagggg 3660

aagggttctt gcgccattct tcagtttgca tggatgcatg ggtttcattt tgtaacacgt 3720

aataaggaca atgaagtgca ggtgtctctc aagtttcaga ggggatatgt ggacagaaga 3780

agaacggcga tgatattgat ggaaatggcc atctagtgtg aatctattcg gttgataata 3840

ctagtgcatt ttggccgtta atcccttcaa ttaactgcac aaacttcagt tgagtattga 3900

ttatttgatt ataggttctg taaacacaat accaagttta tttagagggg agacatacaa 3960

atagtttcga tataaataat agagtggtta aacttagtta ttaaaactat atataaagtc 4020

taaaagttaa attatttttt taattgcaaa tatataaagt ctaaaggggt tacattattt 4080

cttaagagat gtaactctgt tggaatctga cttaatccgt ctcatcactc tggtttccag 4140

ttctaatcta atgaattgtt ttctgccaaa gaatttgaag caagaagtaa attgatcaat 4200

gccgtcaacc cacaccaaac cgtcaaccca ctaccatcgc cgcggagacc cccaaactca 4260

acctccaccc atcggtaaga agcacagggc agcccgcacc accaccaatt tggcgtgcat 4320

gacacctagg gacttggcac gggaggcggc gcacgtggat gcaaatgacg ggatatcaga 4380

tgacaggaaa cgacgttgag agaccatacg atgtagaata tgagctcacc atcaacgaga 4440

aactaggaaa atcacaaaaa aaacaactct cgtaattgta cgagtggcac agatgggtct 4500

gcctcaacat atctctaata cggcgaagcc tgcccaacac gtagttgccg gaatccggtg 4560

tggagctcac gactctgaaa gataggcgct tcctgtttcg tttcgctcac ccactggacg 4620

tccgtcatgt gatggatttc ggtcattggt ttgctgacaa ccacattctg aagctccatg 4680

agatgagtct tcacaatagg tcctgctcaa taccgtggag ttatggttgc aagtccataa 4740

cttgccgttc gaatattttg cggagccagt cggacgggaa ttggcgagct cggctgacac 4800

ctataaaggc catgacaaga agaaccaaaa gttcttccct aatgctttca tgaggcttcg 4860

ggtcgttatg gatgtcggaa aacccctctt gaaggaacga gacgttatta tgcatgacgg 4920

taagactatt acttgtcagt ataagtatga aagattacct gtcttctgct ttgtttgtgg 4980

attgattgga cacgttgaaa aaaaatgtgc acttcgattt caatactcag agatcgactt 5040

ccctttctc taggagtatt cgatcaaggc attaacatgg aaggaagctc aagctctaaa 5100

ggcttcacaa tggaacctga aaaatttcaa caagcctaaa ctgaaatcga agtcaaatca 5160

cccaaccggg agctctaaat cagcaaacac tcctcctcca cagtatccaa tcatcgtgca 5220

cgatgctcca ggtattgcaa gccaggtatt gcaagctagg agtaggatag agaccttaaa 5280

cgtcgttggt gtgaagagtc atcttcagac ctaatggaga tagatgtaga cggcggcacg 5340

aagactctga aacaccagaa aggctagtcc aggataagga tctgctatcc caactgacct 5400

ctcgttagtc ccaaggcctc tcaactagag caggaggaag gatggtcaca agactaggat 5460

aatgatgttt ccaatatgaa cctgaatgtc catagctaat ttttttagtc ttgcttctgc 5520

acttttgtt tattatgttc tggtgactat gttatttacc cttgtccgta tgcttgaggg 5580

taccctagta gattggttgg ttggtttcca tgtaccagaa ggcttaccct attagttgaa 5640

agttgaaact ttgttcccta ctcaattcct agttgtgtaa atgtatgtat atgtaatgtg 5700

tataaaacgt agtacttaaa tgactaggag tggttcttga gaccgatgag agatgggagc 5760

agaactaaag atgatgacat aattaagaac gaatttgaaa ggctcttagg tttgaatcct 5820

attcgagaat gtttttgtca aagatagtgg cgattttgaa ccaaagaaaa catttaaaaa 5880

atcagtatcc ggttacgttc atgcaaatag aaagtggtct aggatctgat tgtaatttta 5940

gacttaaaga gtctcttaag attcaatcct ggctgtgtac aaaactacaa ataatatatt 6000

ttagactatt tggccttaac taaacttcca ctcattattt actgaggtta gagaatagac 6060

ttgcgaataa acacattccc gagaaatact catgatccca taattagtca gagggtatgc 6120

caatcagatc taagaacaca cattccctca aattttaatg cacatgtaat catagtttag 6180

cacaattcaa aaataatgta gtattaaaga cagaaatttg tagacttttt tttggcgtta 6240

aaagaagact aagtttatac gtacatttta ttttaagtgg aaaaccgaaa ttttccatcg 6300

aaatatatga atttagtata tatatttctg caatgtacta ttttgctatt ttggcaactt 6360

tcagtggact actactttat tacaatgtgt atggatgcat gagtttgagt atacacatgt 6420

ctaaatgcat gctttgtaaa acgtaacgga ccacaaaaga ggatccatac aaatacatct 6480

catagcttcc tccattattt tccgacacaa acagagcatt ttacaacaat taccaacaac 6540

aacaaacaac aaacaacatt acaattacat ttacaattac cataccatgg cctctatcgc 6600

tatccctgct gctcttgctg gaactcttgg atacgttacc tacaatgtgg ctaaccctga 6660

tatcccagct tctgagaaag ttcctgctta cttcatgcag gttgagtact ggggacctac 6720

tatcggaact attggatacc tcctcttcat ctacttcgga aagcgtatca tgcagaacag 6780

atctcaacct ttcggactca agaacgctat gctcgtttac aacttctacc agaccttctt 6840

caacagctac tgcatctacc ttttcgttac ttctcatagg gctcagggac ttaaggtttg 6900

gggaaacatc cctgatatga ctgctaactc ttggggaatc tctcaggtta tctggcttca 6960

ctacaacaac aagtacgttg agcttctcga caccttcttc atggtgatga ggaagaagtt 7020

cgaccagctt tctttccttc acatctacca ccacactctt ctcatctggt catggttcgt 7080

tgttatgaag cttgagcctg ttggagattg ctacttcgga tcttctgtta acaccttcgt 7140

gcacgtgatc atgtactctt actacggact tgctgctctt ggagttaact gtttctggaa 7200

gaagtacatc acccagatcc agatgcttca gttctgtatc tgtgcttctc actctatcta 7260

caccgcttac gttcagaata ccgctttctg gcttccttac cttcaactct gggttatggt 7320

gaacatgttc gttctcttcg ccaacttcta ccgtaagagg tacaagtcta agggtgctaa 7380

gaagcagtga taaggcgcgc ggcgcgccgg gccgccgcca tgtgacagat cgaaggaaga 7440

aagtgtaata agacgactct cactactcga tcgctagtga ttgtcattgt tatatataat 7500

aatgttatct ttcacaactt atcgtaatgc atgtgaaact ataacacatt aatcctactt 7560

gtcatatgat aacactctcc ccatttaaaa ctcttgtcaa tttaaagata taagattctt 7620

taaatgatta aaaaaaatat attataaatt caatcactcc tactaataaa ttattaatta 7680

ttatttattg attaaaaaaa tacttatact aatttagtct gaatagaata attagattct 7740

agtctcatcc cctttaaaac caacttagta aacgtttttt tttttaattt tatgaagtta 7800

agtttttacc ttgtttttaa aaagaatcgt tcataagatg ccatgccaga acattagcta 7860

cacgttacac atagcatgca gccgcggaga attgtttttc ttcgccactt gtcactccct 7920

tcaaacacct aagagcttct ctctcacagc acacacatac aatcacatgc gtgcatgcat 7980

tattacacgt gatcgccatg caaatctcct ttatagccta taaattaact catccgcttc 8040

actctttact caaaccaaaa ctcatcgata caaacaagat taaaaacata cacgaggatc 8100

ttttacaaca attaccaaca acaacaaaca acaaacaaca ttacaattac atttacaatt 8160

accataccat gcctccaagg gactcttact cttatgctgc tcctccttct gctcaacttc 8220

acgaagttga tactcctcaa gagcacgaca agaaagagct tgttatcgga gatagggctt 8280

acgatgttac caacttcgtt aagagacacc ctggtggaaa gatcattgct taccaagttg 8340

gaactgatgc taccgatgct tacaagcagt tccatgttag atctgctaag gctgacaaga 8400

tgcttaagtc tcttccttct cgtcctgttc acaagggata ctctccaaga agggctgatc 8460

ttatcgctga tttccaagag ttcaccaagc aacttgaggc tgagggaatg ttcgagcctt 8520

ctcttcctca tgttgcttac agacttgctg aggttatcgc tatgcatgtt gctggtgctg 8580

ctcttatctg gcatggatac actttcgctg gaatcgctat gcttggagtt gttcagggaa 8640

gatgtggatg gcttatgcat gagggtggac attactctct cactggaaac attgctttcg 8700

acagagctat ccaagttgct tgttacggac ttggatgtgg aatgtctggt gcttggtggc 8760

gtaaccagca taacaagcac catgctactc ctcaaaagct tcagcacgat gttgatcttg 8820

atacccttcc tctcgttgct ttccatgaga gaatcgctgc taaggttaag tctcctgcta 8880

tgaaggcttg gctttctatg caagctaagc ttttcgctcc tgttaccact cttcttgttg 8940

ctcttggatg gcagctttac cttcatccta gacacatgct caggactaag cactacgatg 9000

agcttgctat gctcggaatc agatacggac ttgttggata ccttgctgct aactacggtg 9060

ctggatacgt tctcgcttgt taccttcttt acgttcagct tggagctatg tacatcttct 9120

gcaacttcgc tgtttctcat actcacctcc ctgttgttga gcctaacgag catgctactt 9180

gggttgagta cgctgctaac cacactacta actgttctcc atcttggtgg tgtgattggt 9240

ggatgtctta ccttaactac cagatcgagc accaccttta cccttctatg cctcaattca 9300

gacaccctaa gatcgctcct agagttaagc agcttttcga gaagcacgga cttcactacg 9360

atgttagagg atacttcgag gctatggctg atactttcgc taaccttgat aacgttgccc 9420

atgctcctga gaagaaaatg cagtaatgag atcgttcaaa catttggcaa taaagtttct 9480

taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgcga tgattatcat ataatttctg ttgaattacg 9540

ttaagcacgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga 9600

ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaact 9660

aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tcggtcgatt aaaaatccca 9720

attatatttg gtctaattta gtttggtatt gagtaaaaca aattcgaacc aaaccaaaat 9780

ataaatatat agtttttata tatatgcctt taagactttt tatagaattt tctttaaaaa 9840

atatctagaa atatttgcga ctcttctggc atgtaatatt tcgttaaata tgaagtgctc 9900

catttttatt aactttaaat aattggttgt acgatcactt tcttatcaag tgttactaaa 9960

atgcgtcaat ctctttgttc ttccatattc atatgtcaaa atctatcaaa attcttatat 10020

atctttttcg aatttgaagt gaaatttcga taatttaaaa ttaaatagaa catatcatta 10080

tttaggtatc atattgattt ttatacttaa ttactaaatt tggttaactt tgaaagtgta 10140

catcaacgaa aaattagtca aacgactaaa ataaataaat atcatgtgtt attaagaaaa 10200

ttctcctata agaatatttt aatagatcat atgtttgtaa aaaaaattaa tttttactaa 10260

cacatatatt tacttatcaa aaatttgaca aagtaagatt aaaataatat tcatctaaca 10320

aaaaaaaaac cagaaaatgc tgaaaacccg gcaaaacoga accaatccaa accgatatag 10380

ttggtttggt ttgattttga tataaaccga accaactcgg tccatttgca cccctaatca 10440

taatagcttt aatatttcaa gatattatta agttaacgtt gtcaatatcc tggaaatttt 10500

gcaaaatgaa tcaagcctat atggctgtaa tatgaattta aaagcagctc gatgtggtgg 10560

taatatgtaa tttacttgat tctaaaaaaa tatcccaagt attaataatt tctgctagga 10620

agaaggttag ctacgattta cagcaaagcc agaatacaaa gaaccataaa gtgattgaag 10680

ctcgaaatat acgaaggaac aaatattttt aaaaaaatac gcaatgactt ggaacaaaag 10740

aaagtgatat atttttgtt cttaaacaag catcccctct aaagaatggc agttttcctt 10800

tgcatgtaac tattatgctc ccttcgttac aaaaattttg gactactatt gggaacttct 10860

tctgaaaata gtgatagaac ccacacgagc atgtgctttc catttaattt taaaaaccaa 10920

gaaacataca tacataacat tccatcagcc tctctctctt tttattacgg ttaatgactt 10980

aaaacacatc ttattatccc atccttaaca cctagcagtg tctttatacg atctcatcga 11040

tcaccacttc aaaaccatgc agactgctgc tgcccctgga gctggcatcg gctaggctgg 11100

gtgccgcact gtcccggaag gtccctagcg acttgtttag attgatggga ccacctctca 11160

acttcctgct gctgtccctg ctgctggatg tcctgcctca tctggccgat tgcacgctcc 11220

agtcccctgc atgtgcactc gctcctcaat tgcttaagat catcgcagca gctatcgaag 11280

tgctggctct gttgccctcc tccacggcct tggttgtagt agtagctgcc gccgcccttc 11340

tggacttttt cccacaggaa ccgccgaata attcgataga accacacgag catgtgcttt 11400

catttatttt aaaaaccaag aaacatacat aacatttcat cagcctctct ctctctctct 11460

ctctctctct ctctctctct ctctctctct ctctctttat tacagctgtt acactaactt 11520

aaaacacatt catctcatta ttattattat tatccatcct taacacctag cagtgtcttt 11580

gtacgatctc ataatcgatc acccccttcat caggtatcct taggcttcac tccaacgttg 11640

ttgcagttac ggaacatgta cacaccatca tggttctcaa cgaactggca agatctccaa 11700

gttttccaaa ggctaaccca catgttctca tcggtgtgtc tgtagtgctc tcccataact 11760

ttcttgatgc actcggtagc ttctctagca tggtagaatg ggatccttga aacgtagtga 11820

tggagcacat gagtctcgat gatgtcatgg aagatgattc cgaggattcc gaactctcta 11880

tcgatagtag cagcagcacc cttagcgaaa gtccactctt gagcatcgta atgaggcata 11940

gaagaatcgg tgtgctgaag gaaggtaacg aaaacaagcc agtggttaac aaggatccaa 12000

ggacagaacc atgtgatgaa agtaggccag aatccgaaaa ccttgtaagc ggtgtaaaca 12060

gaagtgaggg tagcaaggat tccaagatca gaaagaacga tgtaccagta gtccttctta 12120

tcgaaaacag ggctagaagg ccagtagtga gacttgaaga acttagaaac accagggtaa 12180

ggttgtccag tagcgttagt agcaaggtaa agagaaagtc ctccaagctg ttggaacaag 12240

agagcgaaaa cagagtagat aggagtttcc tcagcgatat cgtgaaggct ggtaacttgg 12300

tgcttctctt tgaattcctc ggcggtgtaa ggaacgaaaa ccatatctct ggtcatgtgt 12360

ccagtagcct tatggtgctt agcatgagag aacttccagc tgaagtaagg aaccataaca 12420

agagagtgga gaacccatcc aacggtatcg ttaacccatc cgtagttaga gaaagcagaa 12480

tgtccacact catgtccaag gatccagatt ccgaatccga aacaagagat agagaacacg 12540

taagcagacc aagcagcgaa tctaaggaat tcgttaggga gaagagggat gtaggtaagt 12600

ccaacgtaag cgatagcaga gatagccacg atatctctca ccacgtaaga catagacttc 12660

acgagagatc tctcgtaaca gtgcttaggg atagcgtcaa ggatatcctt gatggtgtaa 12720

tctggcacct tgaaaacgtt tccgaaggta tcgatagcgg tcttttgctg cttgaaagat 12780

gcaacgtttc cagaacgcct aacggtctta gtagatccct caaggatctc agatccagac 12840

acggtaacct tagacatggt atggtaattg taaatgtaat tgtaatgttg tttgttgttt 12900

gttgttgttg gtaattgttg taaaattttt ggtggtgatt ggttctttaa ggtgtgagag 12960

tgagttgtga gttgtgtggt gggtttggtg agattgggga tggtgggttt atatagtgga 13020

gactgaggaa tggggtcgtg agtgttaact ttgcatgggc tacacgtggg ttcttttggg 13080

cttacacgta gtattattca tgcaaatgca gccaatacat atacggtatt ttaataatgt 13140

gtgggaatac aatatgccga gtattttact aattttggca atgacaagtg tacatttgga 13200

ttatcttact tggcctctct tgctttaatt tggattattt ttattctctt accttggccg 13260

ttcatattca catccctaaa ggcaagacag aattgaatgg tggccaaaaa ttaaaacgat 13320

ggatatgacc tacatagtgt aggatcaatt aacgtcgaag gaaaatactg attctctcaa 13380

gcatacggac aagggtaaat aacatagtca ccagaacata ataaacaaaa agtgcagaag 13440

caagactaaa aaaattagct atggacattc aggttcatat tggaaacatc attatcctag 13500

tcttgtgacc atccttcctc ctgctctagt tgagaggcct tgggactaac gagaggtcag 13560

ttgggatagc agatccttat cctggactag cctttctggt gtttcagagt cttcgtgccg 13620

ccgtctacat ctatctccat taggtctgaa gatgactctt cacaccaacg acgtttaagg 13680

tctctatcct actcctagct tgcaatacct ggcttgcaat acctggagca tcgtgcacga 13740

tgattggata ctgtggagga ggagtgtttg ctgatttaga gctcccggtt gggtgatttg 13800

acttcgattt cagtttaggc ttgttgaaat ttttcaggtt ccattgtgaa gcctttagag 13860

cttgagcttc cttccatgtt aatgccttga tcgaatactc ctagagaaaa gggaagtcga 13920

tctctgagta ttgaaatcga agtgcacatt ttttttcaac gtgtccaatc aatccacaaa 13980

caaagcagaa gacaggtaat ctttcatact tatactgaca agtaatagtc ttaccgtcat 14040

gcataataac gtctcgttcc ttcaagaggg gttttccgac atccataacg acccgaagcc 14100

tcatgaaagc attagggaag aacttttggt tcttcttgtc atggccttta taggtgtcag 14160

ccgagctcgc caattcccgt ccgactggct ccgcaaaata ttcgaacggc aagttatgga 14220

cttgcaacca taactccacg gtattgagca ggacctattg tgaagactca tctcatggag 14280

cttcagaatg tggttgtcag caaaccaatg accgaaatcc atcacatgac ggacgtccag 14340

tgggtgagcg aaacgaaaca ggaagcgcct atctttcaga gtcgtgagct ccacaccgga 14400

ttccggcaac tacgtgttgg gcaggcttcg ccgtattaga gatatgttga ggcagaccca 14460

tctgtgccac tcgtacaatt acgagagttg tttttttgt gattttccta gtttctcgtt 14520

gatggtgagc tcatattcta catcgtatgg tctctcaacg tcgtttcctg tcatctgata 14580

tcccgtcatt tgcatccacg tgcgccgcct cccgtgccaa gtccctaggt gtcatgcacg 14640

ccaaattggt ggtggtgcgg gctgccctgt gcttcttacc gatgggtgga ggttgagttt 14700

gggggtctcc gcggcgatgg tagtgggttg acggtttggt gtgggttgac ggcattgatc 14760

aatttacttc ttgcttcaaa ttctttggca gaaaacaatt cattagatta gaactggaaa 14820

ccagagtgat gagacggatt aagtcagatt ccaacagagt tacatctctt aagaaataat 14880

gtaacccctt tagactttat atatttgcaa ttaaaaaaat aatttaactt ttagacttta 14940

tatatagttt taataactaa gtttaaccac tctattattt atatcgaaac tatttgtatg 15000

tctcccctct aaataaactt ggtattgtgt ttacagaacc tataatcaaa taatcaatac 15060

tcaactgaag tttgtgcagt taattgaagg gattaacggc caaaatgcac tagtattatc 15120

aaccgaatag attcacacta gatggccatt tccatcaata tcatcgccgt tcttcttctg 15180

tccacatatc ccctctgaaa cttgagagac acctgcactt cattgtcctt attacgtgtt 15240

acaaaatgaa acccatgcat ccatgcaaac tgaagaatgg cgcaagaacc cttccccctc 15300

atttcttatg tggcgaccat ccatttcacc atctcccgct ataaaacacc cccatcactt 15360

cacctagaac atcatcacta cttgcttatc catccaaaag atacccactt ttacaacaat 15420

taccaacaac aacaaacaac aaacaacatt acaattacat ttacaattac cataccatgc 15480

cacctagcgc tgctaagcaa atgggagctt ctactggtgt tcatgctggt gttactgact 15540

cttctgcttt caccagaaag gatgttgctg atagacctga tctcaccatc gttggagatt 15600

ctgtttacga tgctaaggct ttcagatctg agcatcctgg tggtgctcat ttcgtttctt 15660

tgttcggagg aagagatgct actgaggctt tcatggaata ccatagaagg gcttggccta 15720

agtctagaat gtctagattc cacgttggat ctcttgcttc tactgaggaa cctgttgctg 15780

ctgatgaggg ataccttcaa ctttgtgcta ggatcgctaa gatggtgcct tctgtttctt 15840

ctggattcgc tcctgcttct tactgggtta aggctggact tatccttgga tctgctatcg 15900

ctcttgaggc ttacatgctt tacgctggaa agagacttct cccttctatc gttcttggat 15960

ggcttttcgc tcttatcggt cttaacatcc agcatgatgc taaccatggt gctttgtcta 16020

agtctgcttc tgttaacctt gctcttggac tttgtcagga ttggatcgga ggatctatga 16080

tcctttggct tcaagagcat gttgttatgc accacctcca cactaacgat gttgataagg 16140

atcctgatca aaaggctcac ggtgctctta gactcaagcc tactgatgct tggtcaccta 16200

tgcattggct tcagcatctt taccttttgc ctggtgagac tatgtacgct ttcaagcttt 16260

tgttcctcga catctctgag cttgttatgt ggcgttggga gggtgagcct atctctaagc 16320

ttgctggata cctctttatg cctttctttgc ttctcaagct taccttctgg gctagattcg 16380

ttgctttgcc tctttacctt gctccttctg ttcatactgc tgtgtgtatc gctgctactg 16440

ttatgactgg atctttctac ctcgctttct tcttcttcat ctcccacaac ttcgagggtg 16500

ttgcttctgt tggacctgat ggatctatca cttctatgac tagaggtgct agcttcctta 16560

agagacaagc tgagacttct tctaacgttg gaggacctct tcttgctact cttaacggtg 16620

gactcaacta ccaaattgag catcacttgt tccctagagt tcaccatgga ttctacccta 16680

gacttgctcc tcttgttaag gctgagcttg aggctagagg aatcgagtac aagcactacc 16740

ctactatctg gtctaacctt gcttctaccc tcagacatat gtacgctctt ggaagaaggc 16800

ctagatctaa ggctgagtaa tgacaagctt atgtgacgtg aaataataac ggtaaaatat 16860

atgtaataat aataataata aagccacaaa gtgagaatga ggggaagggg aaatgtgtaa 16920

tgagccagta gccggtggtg ctaattttgt atcgtattgt caataaatca tgaattttgt 16980

ggtttttatg tgtttttttа aatcatgaat tttaaatttt ataaaataat ctccaatcgg 17040

aagaacaaca ttccatatcc atgcatggat gtttctttac ccaaatctag ttcttgagag 17100

gatgaagcat caccgaacag ttctgcaact atcgctcaaa agctttaaaa tgaacaacaa 17160

ggaacagagc aacgttccaa agatcccaaa cgaaacatat tatctatact aatactatat 17220

tattaattac tactgcccgg aatcacaatc cctgaatgat tcctattaac tacaagcctt 17280

gttggcggcg gagaagtgat cggcgcggcg agaagcagcg gactcggaga cgaggccttg 17340

gaagatctga gtcgaacggg cagaatcagt attttccttc gacgttaatt gatcctacac 17400

tatgtaggtc atatccatcg ttttaatttt tggccaccat tcaattctgt cttgccttta 17460

gggatgtgaa tatgaacggc caaggtaaga gaataaaaat aatccaaatt aaagcaagag 17520

aggccaagta agataatcca aatgtacact tgtcattgcc aaaattagta aaatactcgg 17580

catattgtat tcccacacat tattaaaata ccgtatatgt attggctgca tttgcatgaa 17640

taatactacg tgtaagccca aaagaaccca cgtgtagccc atgcaaagtt aacactcacg 17700

accccattcc tcagtctcca ctatataaac ccaccatccc caatctcacc aaacccacca 17760

cacaactcac aactcactct cacaccttaa agaaccaatc accaccaaaa attttacaac 17820

aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac attacaatta catttacaat taccatacca 17880

tgagcgctgt taccgttact ggatctgatc ctaagaacag aggatcttct agcaacaccg 17940

agcaagaggt tccaaaagtt gctatcgata ccaacggaaa cgtgttctct gttcctgatt 18000

tcaccatcaa ggacatcctt ggagctatcc ctcatgagtg ttacgagaga agattggcta 18060

cctctctcta ctacgtgttc agagatatct tctgcatgct taccaccgga taccttaccc 18120

ataagatcct ttaccctctc ctcatctctt acacctctaa cagcatcatc aagttcactt 18180

tctgggccct ttacacttac gttcaaggac ttttcggaac cggaatctgg gttctcgctc 18240

atgagtgtgg acatcaagct ttctctgatt acggaatcgt gaacgatttc gttggatgga 18300

cccttcactc ttaccttatg gttccttact tcagctggaa gtactctcat ggaaagcacc 18360

ataaggctac tggacacatg accagagata tggttttcgt tcctgccacc aaagaggaat 18420

tcaagaagtc taggaacttc ttcggtaacc tcgctgagta ctctgaggat tctccactta 18480

gaacccttta cgagcttctt gttcaacaac ttggaggatg gatcgcttac ctcttcgtta 18540

acgttacagg acaaccttac cctgatgttc cttcttggaa atggaaccac ttctggctta 18600

cctctccact tttcgagcaa agagatgctc tctacatctt cctttctgat cttggaatcc 18660

tcacccaggg aatcgttctt actctttggt acaagaaatt cggaggatgg tccctttcca 18720

tcaactggtt cgttccttac atctgggtta accactggct cgttttcatc acattccttc 18780

agcacactga tcctactatg cctcattaca acgctgagga atggactttc gctaagggtg 18840

ctgctgctac tatcgataga aagttcggat tcatcggacc tcacatcttc catgatatca 18900

tcgagactca tgtgcttcac cactactgtt ctaggatccc attctacaac gctagacctg 18960

cttctgaggc tatcaagaaa gttatgggaa agcactacag gtctagcgac gagaacatgt 19020

ggaagtcact ttggaagtct ttcaggtctt gccaatacgt tgacggtgat aacggtgttc 19080

tcatgttccg taacatcaac aactgcggag ttggagctgc tgagaagtaa tgaaggggtg 19140

atcgattatg agatcgtaca aagacactgc taggtgttaa ggatggataa taataataat 19200

aatgagatga atgtgtttta agttagtgta acagctgtaa taaagagaga gagagagaga 19260

gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagaggctga tgaaatgtta tgtatgtttc 19320

ttggttttta aaataaatga aagcacatgc tcgtgtggtt ctatcgaatt attcggcggt 19380

tcctgtggga aaaagtccag aagggccgcc gcagctacta ctacaaccaa ggccgtggag 19440

gagggcaaca gagccagcac ttcgatagct gctgcgatga tcttaagcaa ttgaggagcg 19500

agtgcacatg caggggactg gagcgtgcaa tcggccagat gaggcaggac atccagcagc 19560

agggacagca gcaggaagtt gagaggtggt cccatcaatc taaacaagtc gctagggacc 19620

ttccgggaca gtgcggcacc cagcctagcc gatgccagct ccaggggcag cagcagtctg 19680

catggttttg aagtggtgat cgatgagatc gtataaagac actgctaggt gttaaggatg 19740

ggataataag atgtgtttta agtcattaac cgtaataaaa agagagagag gctgatggaa 19800

tgttatgtat gtatgtttct tggtttttaa aattaaatgg aaagcacatg ctcgtgtggg 19860

ttctatctcg attaaaaatc ccaattatat ttggtctaat ttagtttggt attgagtaaa 19920

acaaattcga accaaaccaa aatataaata tatagttttt atatatatgc ctttaagact 19980

ttttatagaa ttttctttaa aaaatatcta gaaatatttg cgactcttct ggcatgtaat 20040

atttcgttaa atatgaagtg ctccattttt attaacttta aataattggt tgtacgatca 20100

ctttcttatc aagtgttact aaaatgcgtc aatctctttg ttcttccata ttcatatgtc 20160

aaaatctatc aaaattctta tatatctttt tcgaatttga agtgaaattt cgataattta 20220

aaattaaata gaacatatca ttatttaggt atcatattga tttttatact taattactaa 20280

atttggttaa ctttgaaagt gtacatcaac gaaaaattag tcaaacgact aaaataaata 20340

aatatcatgt gttattaaga aaattctcct ataagaatat tttaatagat catatgtttg 20400

taaaaaaaat taatttttac taacacatat atttacttat caaaaatttg acaaagtaag 20460

attaaaataa tattcatcta acaaaaaaaa aaccagaaaa tgctgaaaac ccggcaaaac 20520

cgaaccaatc caaaccgata tagttggttt ggtttgattt tgatataaac cgaaccaact 20580

cggtccattt gcacccctaa tcataatagc tttaatattt caagatatta ttaagttaac 20640

gttgtcaata tcctggaaat tttgcaaaat gaatcaagcc tatatggctg taatatgaat 20700

ttaaaagcag ctcgatgtgg tggtaatatg taatttactt gattctaaaa aaatatccca 20760

agtattaata atttctgcta ggaagaaggt tagctacgat ttacagcaaa gccagaatac 20820

aaagaaccat aaagtgattg aagctcgaaa tatacgaagg aacaaatatt tttaaaaaaa 20880

tacgcaatga cttggaacaa aagaaagtga tatatttttt gttcttaaac aagcatcccc 20940

tctaaagaat ggcagtttte ctttgcatgt aactattatg ctcccttcgt tacaaaaatt 21000

ttggactact attgggaact tcttctgaaa atagtcctgc aggctagtag attggttggt 21060

tggtttccat gtaccagaag gcttacccta ttagttgaaa gttgaaactt tgttcgctac 21120
tcaattccta gttgtgtaaa tgtatgtata tgtaatgtgt ataaaacgta gtacttaaat 21180
gactaggagt ggttcttgag accgatgaga gatgggagca gaactaaaga tgatgacata 21240
attaagaacg aatttgaaag gctcttaggt ttgaatccta ttcgagaatg tttttgtcaa 21300
agatagtggc gattttgaac caaagaaaac atttaaaaaa tcagtatccg gttacgttca 21360
tgcaaataga aagtggtcta ggatctgatt gtaattttag acttaaagag tctcttaaga 21420
ttcaatcctg gctgtgtaca aaactacaaa taatatattt tagactattt ggccttaact 21480
aaacttccac tcattattta ctgaggttag agaatagact tgcgaataaa cacattcccg 21540
agaaatactc atgatcccat aattagtcag agggtatgcc aatcagatct aagaacacac 21600
attcgctcaa attttaatgc acatgtaatc atagtttagc acaattcaaa aataatgtag 21660
tattaaagac agaaatttgt agacttttt ttggcgttaa aagaagacta agtttatacg 21720
tacattttat tttaagtgga aaaccgaaat tttccatcga aatatatgaa tttagtatat 21780
atatttctgc aatgtactat tttgctattt tggcaacttt cagtggacta ctactttatt 21840
acaatgtgta tggatgcatg agtttgagta tacacatgtc taaatgcatg ctttgtaaaa 21900
cgtaacggac cacaaaagag gatccataca aatacatctc atagcttcct ccattatttt 21960
ccgacacaaa cagagcattt tacaacaatt accaacaaca acaaacaaca aacaacatta 22020
caattacatt tacaattacc ataccatgga atttgctcaa cctctcgttg ctatggctca 22080
agagcagtac gctgctatcg atgctgttgt tgctcctgct atcttctctg ctaccgactc 22140
tattggatgg ggactcaagc ctatctcttc tgctactaag gatctcgctc tcgttgaatc 22200
tcctaccgct cttatccttt ctctcctcgc ttacttcgct atcgttggtt ctggactcgt 22260
ttaccgtaaa gtgttcccta gaaccgttaa gggacaggat cctttccttc tcaaggctct 22320
tatgctcgct cacaacgttt tccttatcgg actcagcctt tacatgtgcc tcaagctcgt 22380
ttacgaggct tacgtgaaca agtactcctt ctggggaaac gcttacaacc ctgctcaaac 22440
cgagatggct aaggtgatct ggatcttcta cgtgtccaag atctacgagt tcatggacac 22500
cttcatcatg cttctcaagg gaaacgttaa ccaggtttcc ttcctccatg tttaccacca 22560
cggatctatc tctggaatct ggtggatgat cacttatgct gctccaggtg gagatgctta 22620
cttctctgct gctctcaact cttgggttca tgtgtgcatg tacacctact acttcatggc 22680
tgctgttctt cctaaggacg aaaagaccaa gagaaagtac ctttggtggg gaagatacct 22740
tacccagatg caaatgttcc agttcttcat gaaccttctc caggctgttt acctcctcta 22800
ctcttcttct ccttacccta agttcattgc tcaactcctc gttgtttaca tggttacccc 22860
cctcatgctt ttcggaaact tctactacat gaagcaccac gcttctaagt gataagggcc 22920
gccgccatgt gacagatcga aggaagaaag tgtaataaga cgactctcac tactcgatcg 22980

ctagtgattg tcattgttat atataataat gttatctttc acaacttatc gtaatgcatg 23040
tgaaactata acacattaat cctacttgtc atatgataac actctcccca tttaaaactc 23100
ttgtcaattt aaagatataa gattctttaa atgattaaaa aaaatatatt ataaattcaa 23160
tcactcctac taataaatta ttaattatta tttattgatt aaaaaaatac ttatactaat 23220
ttagtctgaa tagaataatt agattctagc ctgcagggcg gccgcggatc ccatggagtc 23280
aaagattcaa atagaggacc taacagaact cgccgtaaag actggcgaac agttcataca 23340
gagtctctta cgactcaatg acaagaagaa aatcttcgtc aacatggtgg agcacgacac 23400
acttgtctac tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg caattgagac 23460
ttttcaacaa agggtaatat ccggaaacct cctcggattc cattgcccag ctatctgtca 23520
ctttattgtg aagatagtgg aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc attgcgataa 23580
aggaaaggcc atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggt cccaaagatg gacccccacc 23640
cacgaggagc atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg 23700
atgtgatatc tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagaccc 23760
ttcctctata taaggaagtt catttcattt ggagagaaca cgggggactg aattaaatat 23820
gagccctgag aggcgtcctg ttgaaatcag acctgctact gctgctgata tggctgctgt 23880
ttgtgatatc gtgaaccact acatcgagac ttctaccgtt aacttcagaa ctgagcctca 23940
aactcctcaa gagtggatcg atgatcttga gagactccaa gatagatacc cttggcttgt 24000
tgctgaggtt gagggtgttg ttgctggaat cgcttacgct ggaccttgga aggctagaaa 24060
cgcttacgat tggactgttg agtctaccgt ttacgtttca cacagacatc agagacttgg 24120
acttggatct acccttaca ctcaccttct caagtctatg gaagctcagg gattcaagtc 24180
tgttgttgct gttatcggac tccctaacga tccttctgtt agacttcatg aggctcttgg 24240
atacactgct agaggaactc ttagagctgc tggatacaag cacggtggat ggcatgatgt 24300
tggattctgg caaagagatt tcgagcttcc tgctcctcct agacctgtta gaccagttac 24360
tcagatctga atttgcgtga tcgttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat 24420
cctgttgccg gtcttgcgat gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta 24480
ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg tttttatgat tagagtcccg 24540
caattataca tttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaacta ggataaatta 24600
tcgcgcgcgg tgtcatctat gttactagat cactagtgat gtacggttaa aaccacccca 24660
gtacattaaa aacgtccgca atgtgttatt aagttgtcta agcgtcaatt tgtttacacc 24720
acaatatatc ctgccaccag ccagccaaca gctccccgac cggcagctcg gcacaaaatc 24780
accactcgat acaggcagcc catcagtcc 24809

<210> 6

<211> 26543
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência de nucleótidos de pGA7- mod_F

<400> 6

tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttca cgccctttta 60

aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120

tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180

tcacgacgtt gtaaaacggg cgggcggccg cctagaatct aattattcta ttcagactaa 240

attagtataa gtatttttt aatcaataaa tattaattaa taatttatta gtaggagtga 300

ttgaatttat aatatatttt ttttaatcat ttaaagaatc ttatatcttt aaattgacaa 360

gagttttaaa tggggagagt gttatcatat gacaagtagg attaatgtgt tatagtttca 420

catgcattac gataagttgt gaaagataac attattatat ataacaatga caatcactag 480

cgatcgagta gtgagagtcg tcttattaca ctttcttcct tcgatctgtc acatggcggc 540

ggcccgcgat cgcgataatt ctcagtgcgc cttctccgcc ttgccgttga cgtagtagtg 600

ctgcccgacc ttatccaagt tcgagaacgt cgccttccag gcgccgtaat aggacagcac 660

cttgtagttc agcccccact tcttcgcgaa cgggacgaac cgccggctca cctccggctg 720

gcgaaactgc ggcatgtccg ggaacaggtg atgaatgacc tggcagttca gatatcccat 780

caaccagttc acgtacccgc gcgacgggtc gatgtccacg gtgtgatcga ccgcgtagtt 840

cacccagctc aggtgcttat ccgagggcac gaccgggagg tgcgtgtggc tcgtggagaa 900

gtgcgcgaag aggtacatgt acgcgatcca gttgccgaag gtgaaccacc agtacgcgac 960

gggccacgag taccccgtcg cgagtttaat caccgcggtc ctgacgacgt gagagacgag 1020

catccacgac gcctcctcgt agttcttctt tcgcaacacc tgccgcgggt gcaggacgta 1080

gatccagaac gcctggacga gcagcccgga ggtcaccggg acgaacgtcc acgcctgaag 1140

ccgagcccac gcgcgggaga accccctcgg ccggttgtcc tccacggcgg tgttaaaaaa 1200

cgccaccgcg ggggtcgtgt ccaggtccat gtcgtgcctc actttctgcg gcgtcgcgtg 1260

gtgcttattg tgcatctggt tccacatctc cccgctcgtg gacagcccga acccgcacgt 1320

catcgcttgg aggcgcttgt cgacgtagac ggaccccgtg agcgagttgt gcccgccctc 1380

gtgctggacc caaccgcacc gagcgccgaa gaacgcgccg tacacgacgg acgcgatgat 1440

cgggtacccg gcgtacatga gggcggtgcc gagggcgaag gtcgcgagga gctcgagtaa 1500

ccgatacgcg acgtgcgtta tcgagggctt aaagaacccg tcgcgttcga gctccgcgcg 1560

ccaccgcgcg aaatcctcca acatcggcgc gtcctcgctc tcgctgcgtt tgatctccgc 1620

ggggcgcgac ggcagcgctc tgagcatctt ccacgcctta agcgatcgca tgtggaactc 1680

cttgaacgcc tccgtggcgt ccgcgcccgt gttcgcgagc atgtagaata tcacgctgcc 1740

tcccgggtgt ttgaagtttg tgacgtcgta ctcgacgtcc tccacgcgca cccatcgcgt 1800

ctcgaacgtc gccgcgagct cgtgcggctc gagcgttttg agatcgacgg gcgcggtcga 1860

cgcgtccttg gcgtcgagcg cctccgcgga ggatttgctg cgcgtcagcg gcgatcgcgg 1920

ggacgatcgg ccgtccgtct tcggcgggca catcgtcgcg cgcgcgactt aaaccgacga 1980

cggacggacg aacctgcaac ggcgaattat caattgacgc gttgctctgt ttgtgtcgga 2040

aaataatgga ggaagctatg agatgtattt gcatggatcc tcttttgtgg tccgttacgt 2100

tttgcaaagc atgcatttag acatgtgtat actcaaactc atgcatccat acacattgta 2160

ataaagtagt agtccactga aagttgccaa aatagcaaaa tagtacattg cagaaatata 2220

tatactaaat tcatatattt cgatggaaaa tttcggtttt ccacttaaaa taaaatgtac 2280

gtataaactt agtcttcctt taacgccaaa aaaaagtcta caaatttctg tctttaatac 2340

tacattattt ttgaattgtg ctaaactatg attacatgtg cattaaaatt tgagggaatg 2400

tgtgttctta gatctgattg gcataccctc tgactaatta tgggatcatg agtatttctc 2460

gggaatgtgt ttattcgcaa gtctattctc taacctcagt aaataatgag tggaagttta 2520

gttaaggcca aatagtctaa aatatattat ttgtagtttt gtacacagcc aggattgaat 2580

cttaagagac tctttaagtc taaaattaca atcagatcct agaccacttt ctatttgcat 2640

gaacgtaacc ggatactgat tttttaaatg ttttctttgg ttcaaaatcg ccactatctt 2700

tgacaaaaac attctcgaat aggattcaaa cctaagagcc tttcaaattc gttcttaatt 2760

atgtcatcat ctttagttct gctcccatct ctcatcggtc tcaagaacca ctcctagtca 2820

tttaagtact acgttttata cgcattacat atacatacat ttacacaact aggaattgag 2880

tagggaacaa agtttcaact ttcaactaat agggtaagcc ttctggtaca tggaaaccaa 2940

ccaaccaatc tactaggcgg ccgcccgtcg ggatcttctg caagcatctc tatttcctga 3000

aggtctaacc tcgaagattt aagatttaat tacgtttata attacaaaat tgattctagt 3060

atctttaatt taatgcttat acattattaa ttaatttagt actttcaatt tgttttcaga 3120

aattatttta ctatttttta taaaataaaa gggagaaaat ggctatttaa actgaaggcg 3180

ggaaacgaca atctgctagt ggatctccca gtcacgacgt tgtaaaacgg gcgccccgcg 3240

gaaagcttgc ggccgcggta ccgcccgttc gactcagatc ttccaaggcc tcgtctccga 3300

gtccgctgct tctcgccgcg ccgatcactt ctccgccgcc aacaaggctt gtagttaata 3360

ggaatcattc agggattgtg attccgggca gtagtaatta ataatatagt attagtatag 3420

ataatatgtt tcgtttggga tctttggaac gttgctctgt tccttgttgt tcattttaaa 3480

gcttttgagg gatagttgca gaactgttcg gtgatgcttc atcctctcaa gaactagatt 3540

tgggtaaaga aacatccatg catggatatg gaatgttgtt cttccgattg gagattattt 3600

tataaaattt aaaattcatg atttaaaaaa acacataaaa accacaaaat tcatgattta 3660

ttgacaatac gatacaaaat tagcaccacc ggctactggc tcattacaca tttccccttc 3720

ccctcattct cactttgtgg ctttattatt attattatta catatatttt accgttatta 3780

tttcacgtca cataagcttg ttaattaatc attagtgagc cttctcagcc tttccgttaa 3840

cgtagtagtg ctgtcccacc ttatcaaggt tagagaaagt agccttccaa gcaccgtagt 3900

aagagagcac cttgtagttg agtccccact tcttagcgaa aggaacgaat cttctgctaa 3960

cctcaggctg tctgaattga ggcatatcag ggaagaggtg gtggataacc tgacagttaa 4020

ggtatcccat aagccagttc acgtatcctc tagaaggatc gatatcaacg gtgtgatcaa 4080

cagcgtagtt aacccaagaa aggtgcttat cagatggaac aacagggagg tgagtatgag 4140

aagtagagaa gtgagcgaaa aggtacatgt aagcgatcca gtttccgaaa gtgaaccacc 4200

agtaagcaac aggccaagag tatccagtag caagcttgat aacagcggtt ctaacaacat 4260

gagaaacgag catccaagaa gcctcttcgt agttcttctt acggagaact tgtctagggt 4320

ggagaacgta gatccagaaa gcttgaacaa gaagtccaga ggtaacagga acgaaagtcc 4380

aagcttgaag tctagcccaa gctctagaga atcctctagg tctgttatcc tcaacagcag 4440

tgttgaagaa agccacagca ggagtggtat caagatccat atcgtgtcta acctttgag 4500

gggtagcatg gtgcttgtta tgcatctggt tccacatctc accagaagta gaaagtccga 4560

atccacaagt catagcctga agtctcttgt ccacgtaaac agatccggta agagagttat 4620

gtccacccta atgttgaacc catccacatc tagctccgaa gaaagcaccg taaacaacag 4680

aagcaatgat agggtatcca gcgtacataa gagcagttcc aagagcgaat gtagcaagaa 4740

gctcgagaag tctgtaagcc acatgggtga tagaaggctt gaagaatcca tctctctcaa 4800

gctcagcacg ccatctagcg aaatcctcaa gcataggagc atcctcagac tcagatctct 4860

tgatctcagc aggtctagaa ggcaaagctc taagcatctt ccaagccttg agagaacgca 4920

tgtggaattc tttgaaagcc tcagtagcat cagcaccagt gttagcaagc atgtagaaga 4980

tcacagatcc accagggtgc ttgaagttag tcacatcgta ctcaacgtcc tcaactctaa 5040

cccatctagt ctcgaaagta gcagcaagct catgaggctc aagagtctta agatcaacag 5100

gagcagtaga agcatcctta gcatcaagag cctcagcaga agatttagac ctggtaagtg 5160

gagatctagg agaagatctt ccatcagtct taggagggca catggtatgg taattgtaaa 5220

tgtaattgta atgttgtttg ttgtttgttg ttgttggtaa ttgttgtaaa attaattaag 5280

tgggtatctt ttggatggat aagcaagtag tgatgatgtt ctaggtgaag tgatgggggt 5340

gttttatagc gggagatggt gaaatggatg gtcgccacat aagaaatgga ggggaagggt 5400

tcttgcgcca ttcttcagtt tgcatggatg catgggtttc attttgtaac acgtaataag 5460

gacaatgaag tgcaggtgtc tctcaagttt cagaggggat atgtggacag aagaagaacg 5520

gcgatgatat tgatggaaat ggccatctag tgtgaatcta ttcggttgat aatactagtg 5580

cattttggcc gttaatcccc tcaattaact gcacaaactt cagttgagta ttgattattt 5640

gattataggt tctgtaaaca caataccaag tttatttaga ggggagacat acaaatagtt 5700

tcgatataaa taatagagtg gttaaactta gttattaaaa ctatatataa agtctaaaag 5760

ttaaattatt tttttaattg caaatatata aagtctaaag gggttacatt atttcttaag 5820

agatgtaact ctgttggaat ctgacttaat ccgtctcatc actctggttt ccagttctaa 5880

tctaatgaat tgttttctgc caaagaattt gaagcaagaa gtaaattgat caatgccgtc 5940

aacccacacc aaaccgtcaa cccactacca tcgccgcgga gacccccaaa ctcaacctcc 6000

acccatcggt aagaagcaca gggcagcccg caccaccacc aatttggcgt gcatgacacc 6060

tagggacttg gcacgggagg cggcgcacgt ggatgcaaat gacgggatat cagatgacag 6120

gaaacgacgt tgagagacca tacgatgtag aatatgagct caccatcaac gagaaactag 6180

gaaaatcaca aaaaaaacaa ctctcgtaat tgtacgagtg gcacagatgg gtctgcctca 6240

acatatctct aatacggcga agcctgccca acacgtagtt gccggaatcc ggtgtggagc 6300

tcacgactct gaaagatagg cgcttcctgt ttcgtttcgc tcacccactg gacgtccgtc 6360

atgtgatgga tttcggtcat tggtttgctg acaaccacat tctgaagctc catgagatga 6420

gtcttcacaa taggtcctgc tcaataccgt ggagttatgg ttgcaagtcc ataacttgcc 6480

gttcgaatat tttgcggagc cagtcggacg ggaattggcg agctcggctg acacctataa 6540

aggccatgac aagaagaacc aaaagttctt ccctaatgct ttcatgaggc ttcgggtcgt 6600

tatggatgtc ggaaaacccc tcttgaagga acgagacgtt attatgcatg acggtaagac 6660

tattacttgt cagtataagt atgaaagatt acctgtcttc tgctttgttt gtggattgat 6720

tggacacgtt gaaaaaaaat gtgcacttcg atttcaatac tcagagatcg acttcccttt 6780

tctctaggag tattcgatca aggcattaac atggaaggaa gctcaagctc taaaggcttc 6840

acaatggaac ctgaaaaatt tcaacaagcc taaactgaaa tcgaagtcaa atcacccaac 6900

cgggagctct aaatcagcaa acactcctcc tccacagtat ccaatcatcg tgcacgatgc 6960

tccaggtatt gcaagccagg tattgcaagc taggagtagg atagagacct taaacgtcgt 7020

tggtgtgaag agtcatcttc agacctaatg gagatagatg tagacggcgg cacgaagact 7080

ctgaaacacc agaaaggcta gtccaggata aggatctgct atcccaactg acctctcgtt 7140

agtcccaagg cctctcaact agagcaggag gaaggatggt cacaagacta ggataatgat 7200

gtttccaata tgaacctgaa tgtccatagc taatttttttt agtcttgctt ctgcactttt 7260

tgtttattat gttctggtga ctatgttatt tacccttgtc cgtatgcttg agggtaccct 7320

agtagattgg ttggttggtt tccatgtacc agaaggctta ccctattagt tgaaagttga 7380

aactttgttc cctactcaat tcctagttgt gtaaatgtat gtatatgtaa tgtgtataaa 7440

acgtagtact taaatgacta ggagtggttc ttgagaccga tgagagatgg gagcagaact 7500

aaagatgatg acataattaa gaacgaattt gaaaggctct taggtttgaa tcctattcga 7560

gaatgttttt gtcaaagata gtggcgattt tgaaccaaag aaaacattta aaaaatcagt 7620

atccggttac gttcatgcaa atagaaagtg gtctaggatc tgattgtaat tttagactta 7680

aagagtctct taagattcaa tcctggctgt gtacaaaact acaaataata tattttagac 7740

tatttggcct taactaaact tccactcatt attactgag gttagagaat agacttgcga 7800

ataaacacat tcccgagaaa tactcatgat cccataatta gtcagagggt atgccaatca 7860

gatctaagaa cacacattcc ctcaaatttt aatgcacatg taatcatagt ttagcacaat 7920

tcaaaaataa tgtagtatta aagacagaaa tttgtagact ttttttggc gttaaaagaa 7980

gactaagttt atacgtacat tttatttaa gtggaaaacc gaaattttcc atcgaaatat 8040

atgaatttag tatatatatt tctgcaatgt actattttgc tattttggca actttcagtg 8100

gactactact ttattacaat gtgtatggat gcatgagttt gagtatacac atgtctaaat 8160

gcatgctttg taaaacgtaa cggaccacaa aagaggatcc atacaaatac atctcatagc 8220

ttcctccatt attttccgac acaaacagag cattttacaa caattaccaa caacaacaaa 8280

caacaaacaa cattacaatt acatttacaa ttaccatacc atggcctcta tcgctatccc 8340

tgctgctctt gctggaactc ttggatacgt tacctacaat gtggctaacc ctgatatccc 8400

agcttctgag aaagttcctg cttacttcat gcaggttgag tactggggac ctactatcgg 8460

aactattgga tacctcctct tcatctactt cggaaagcgt atcatgcaga acagatctca 8520

acctttcgga ctcaagaacg ctatgctcgt ttacaacttc taccagacct tcttcaacag 8580

ctactgcatc tacctttttcg ttacttctca tagggctcag ggacttaagg tttggggaaa 8640

catccctgat atgactgcta actcttgggg aatctctcag gttatctggc ttcactacaa 8700

caacaagtac gttgagcttc tcgacacctt cttcatggtg atgaggaaga agttcgacca 8760

gctttctttc cttcacatct accaccacac tcttctcatc tggtcatggt tcgttgttat 8820

gaagcttgag cctgttggag attgctactt cggatcttct gttaacacct tcgtgcacgt 8880

gatcatgtac tcttactacg gacttgctgc tcttggagtt aactgtttct ggaagaagta 8940

catcacccag atccagatgc ttcagttctg tatctgtgct tctcactcta tctacaccgc 9000

ttacgttcag aataccgctt tctggcttcc ttaccttcaa ctctgggtta tggtgaacat 9060

gttcgttctc ttcgccaact tctaccgtaa gaggtacaag tctaagggtg ctaagaagca 9120

gtgataaggc gcgcggcgcg ccgggccgcc gccatgtgac agatcgaagg aagaaagtgt 9180

aataagacga ctctcactac tcgatcgcta gtgattgtca ttgttatata taataatgtt 9240
atctttcaca acttatcgta atgcatgtga aactataaca cattaatcct acttgtcata 9300
tgataacact ctccccattt aaaactcttg tcaatttaaa gatataagat tctttaaatg 9360
attaaaaaaa atatattata aattcaatca ctcctactaa taaattatta attattattt 9420
attgattaaa aaaatactta tactaattta gtctgaatag aataattaga ttctagtctc 9480
atccccttt aaaccaactt agtaaacgtt ttttttttta attttatgaa gttaagtttt 9540
taccttgttt ttaaaaagaa tcgttcataa gatgccatgc cagaacatta gctacacgtt 9600
acacatagca tgcagccgcg gagaattgtt tttcttcgcc acttgtcact ccctttaaac 9660
acctaagagc ttctctctca cagcacacac atacaatcac atgcgtgcat gcattattac 9720
acgtgatcgc catgcaaatc tcctttatag cctataaatt aactcatccg cttcactctt 9780
tactcaaacc aaaactcatc gatacaaaca agattaaaaa catacacgag gatcttttac 9840
aacaattacc aacaacaaca aacaacaaac aacattacaa ttacatttac aattaccata 9900
ccatgcctcc aagggactct tactcttatg ctgctcctcc ttctgctcaa cttcacgaag 9960
ttgatactcc tcaagagcac gacaagaaag agcttgttat cggagatagg gcttacgatg 10020
ttaccaactt cgttaagaga caccctggtg gaaagatcat tgcttaccaa gttggaactg 10080
atgctaccga tgcttacaag cagttccatg ttagatctgc taaggctgac aagatgctta 10140
agtctcttcc ttctcgtcct gttcacaagg gatactctcc aagaagggct gatcttatcg 10200
ctgatttcca agagttcacc aagcaacttg aggctgaggg aatgttcgag ccttctcttc 10260
ctcatgttgc ttacagactt gctgaggtta tcgctatgca tgttgctggt gctgctctta 10320
tctggcatgg atacactttc gctggaatcg ctatgcttgg agttgttcag ggaagatgtg 10380
gatggcttat gcatgagggt ggacattact ctctcactgg aaacattgct ttcgacagag 10440
ctatccaagt tgcttgttac ggacttggat gtggaatgtc tggtgcttgg tggcgtaacc 10500
agcataacaa gcaccatgct actcctcaaa agcttcagca cgatgttgat cttgataccc 10560
ttcctctcgt tgctttccat gagagaatcg ctgctaaggt taagtctcct gctatgaagg 10620
cttggctttc tatgcaagct aagcttttcg ctcctgttac cactcttctt gttgctcttg 10680
gatggcagct ttaccttcat cctagacaca tgctcaggac taagcactac gatgagcttg 10740
ctatgctcgg aatcagatac ggacttgttg gataccttgc tgctaactac ggtgctggat 10800
acgttctcgc ttgttacctt ctttacgttc agcttggagc tatgtacatc ttctgcaact 10860
tcgctgtttc tcatactcac ctccctgttg ttgagcctaa cgagcatgct acttgggttg 10920
agtacgctgc taaccacact actaactgtt ctccatcttg gtggtgtgat tggtggatgt 10980
cttaccttaa ctaccagatc gagcaccacc tttacccttc tatgcctcaa ttcagacacc 11040

ctaagatcgc tcctagagtt aagcagcttt tcgagaagca cggacttcac tacgatgtta 11100

gaggatactt cgaggctatg gctgatactt tcgctaacct tgataacgtt gcccatgctc 11160

ctgagaagaa aatgcagtaa tgagatcgtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat 11220

tgaatcctgt tgccggtctt gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc 11280

acgtaataat taacatgtaa tgcatgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag 11340

tcccgcaatt atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata 11400

aattatcgcg cgcggtgtca tctatgttac tagatcggtc gattaaaaat cccaattata 11460

tttggtctaa tttagtttgg tattgagtaa aacaaattcg aaccaaacca aaatataaat 11520

atatagtttt tatatatatg cctttaagac tttttataga attttcttta aaaaatatct 11580

agaaatattt gcgactcttc tggcatgtaa tatttcgtta aatatgaagt gctccatttt 11640

tattaacttt aaataattgg ttgtacgatc actttcttat caagtgttac taaaatgcgt 11700

caatctcttt gttcttccat attcatatgt caaaatctat caaaattctt atatatcttt 11760

ttcgaatttg aagtgaaatt tcgataattt aaaattaaat agaacatatc attatttagg 11820

tatcatattg atttttatac ttaattacta aatttggtta actttgaaag tgtacatcaa 11880

cgaaaaatta gtcaaacgac taaaataaat aaatatcatg tgttattaag aaaattctcc 11940

tataagaata ttttaataga tcatatgttt gtaaaaaaaa ttaattttta ctaacacata 12000

tatttactta tcaaaaattt gacaaagtaa gattaaaata atattcatct aacaaaaaaa 12060

aaaccagaaa atgctgaaaa cccggcaaaa ccgaaccaat ccaaaccgat atagttggtt 12120

tggtttgatt ttgatataaa ccgaaccaac tcggtccatt tgcaccccta atcataatag 12180

ctttaatatt tcaagatatt attaagttaa cgttgtcaat atcctggaaa ttttgcaaaa 12240

tgaatcaagc ctatatggct gtaatatgaa tttaaaagca gctcgatgtg gtggtaatat 12300

gtaatttact tgattctaaa aaaatatccc aagtattaat aatttctgct aggaagaagg 12360

ttagctacga tttacagcaa agccagaata caaagaacca taaagtgatt gaagctcgaa 12420

atatacgaag gaacaaatat ttttaaaaaa atacgcaatg acttggaaca aaagaaagtg 12480

atatattttt tgttcttaaa caagcatccc ctctaaagaa tggcagtttt cctttgcatg 12540

taactattat gctcccttcg ttacaaaaat tttggactac tattgggaac ttcttctgaa 12600

aatagtgata gaacccacac gagcatgtgc tttccattta attttaaaaa ccaagaaaca 12660

tacatacata acattccatc agcctctctc tctttttatt acggttaatg acttaaaaca 12720

catcttatta tcccatcctt aacacctagc agtgtcttta tacgatctca tcgatcacca 12780

cttcaaaacc atgcagactg ctgctgcccc tggagctggc atcggctagg ctgggtgccg 12840

cactgtcccg gaaggtccct agcgacttgt ttagattgat gggaccacct ctcaacttcc 12900

tgctgctgtc cctgctgctg gatgtcctgc ctcatctggc cgattgcacg ctccagtccc 12960

ctgcatgtgc actcgctcct caattgctta agatcatcgc agcagctatc gaagtgctgg 13020

ctctgttgcc ctcctccacg gccttggttg tagtagtagc tgccgccgcc cttctggact 13080

ttttcccaca ggaaccgccg aataattcga tagaaccaca cgagcatgtg ctttcattta 13140

ttttaaaaac caagaaacat acataacatt tcatcagcct ctctctctct ctctctctct 13200

ctctctctct ctctctctct ctctctctct ttattacagc tgttacacta acttaaaaca 13260

cattcatctc attattatta ttattatcca tccttaacac ctagcagtgt ctttgtacga 13320

tctcataatc gatcacccct tcatcaggta tccttaggct tcactccaac gttgttgcag 13380

ttacggaaca tgtacacacc atcatggttc tcaacgaact ggcaagatct ccaagttttc 13440

caaaggctaa cccacatgtt ctcatcggtg tgtctgtagt gctctcccat aactttcttg 13500

atgcactcgg tagcttctct agcatggtag aatgggatcc ttgaaacgta gtgatggagc 13560

acatgagtct cgatgatgtc atggaagatg attccgagga ttccgaactc tctatcgata 13620

gtagcagcag cacccttagc gaaagtccac tcttgagcat cgtaatgagg catagaagaa 13680

tcggtgtgct gaaggaaggt aacgaaaaca agccagtggt taacaaggat ccaaggacag 13740

aaccatgtga tgaaagtagg ccagaatccg aaaaccttgt aagcggtgta aacagaagtg 13800

agggtagcaa ggattccaag atcagaaaga acgatgtacc agtagtcctt cttatcgaaa 13860

acagggctag aaggccagta gtgagacttg aagaacttag aaacaccagg gtaaggttgt 13920

ccagtagcgt tagtagcaag gtaaagagaa agtcctccaa gctgttggaa caagagagcg 13980

aaaacagagt agataggagt ttcctcagcg atatcgtgaa ggctggtaac ttggtgcttc 14040

tctttgaatt cctcggcggt gtaaggaacg aaaaccatat ctctggtcat gtgtccagta 14100

gccttatggt gcttagcatg agagaacttc cagctgaagt aaggaaccat aacaagagag 14160

tggagaaccc atccaacggt atcgttaacc catccgtagt tagagaaagc agaatgtcca 14220

cactcatgtc caaggatcca gattccgaat ccgaaacaag agatagagaa cacgtaagca 14280

gaccaagcag cgaatctaag gaattcgtta gggagaagag ggatgtaggt aagtccaacg 14340

taagcgatag cagagatagc cacgatatct ctcaccacgt aagacataga cttcacgaga 14400

gatctctcgt aacagtgctt agggatagcg tcaaggatat ccttgatggt gtaatctggc 14460

accttgaaaa cgtttccgaa ggtatcgata gcggtctttt gctgcttgaa agatgcaacg 14520

tttccagaac gcctaacggt cttagtagat ccctcaagga tctcagatcc agacacggta 14580

accttagaca tggtatggta attgtaaatg taattgtaat gttgtttgtt gtttgttgtt 14640

gttggtaatt gttgtaaaat ttttggtggt gattggttct ttaaggtgtg agagtgagtt 14700

gtgagttgtg tggtgggttt ggtgagattg gggatggtgg gtttatatag tggagactga 14760

ggaatggggt cgtgagtgtt aactttgcat gggctacacg tgggttcttt tgggcttaca 14820

cgtagtatta ttcatgcaaa tgcagccaat acatatacgg tattttaata atgtgtggga 14880
atacaatatg ccgagtattt tactaatttt ggcaatgaca agtgtacatt tggattatct 14940
tacttggcct ctcttgcttt aatttggatt atttttattc tcttaccttg gccgttcata 15000
ttcacatccc taaaggcaag acagaattga atggtggcca aaaattaaaa cgatggatat 15060
gacctacata gtgtaggatc aattaacgtc gaaggaaaat actgattctc tcaagcatac 15120
ggacaagggt aaataacata gtcaccagaa cataataaac aaaaagtgca gaagcaagac 15180
taaaaaaatt agctatggac attcaggttc atattggaaa catcattatc ctagtcttgt 15240
gaccatcctt cctcctgctc tagttgagag gccttgggac taacgagagg tcagttggga 15300
tagcagatcc ttatcctgga ctagcctttc tggtgtttca gagtcttcgt gccgccgtct 15360
acatctatct ccattaggtc tgaagatgac tcttcacacc aacgacgttt aaggtctcta 15420
tcctactcct agcttgcaat acctggcttg caatacctgg agcatcgtgc acgatgattg 15480
gatactgtgg aggaggagtg tttgctgatt tagagctccc ggttgggtga tttgacttcg 15540
atttcagttt aggcttgttg aaatttttca ggttccattg tgaagccttt agagcttgag 15600
cttccttcca tgttaatgcc ttgatcgaat actcctagag aaaagggaag tcgatctctg 15660
agtattgaaa tcgaagtgca catttttttt caacgtgtcc aatcaatcca caaacaaagc 15720
agaagacagg taatctttca tacttatact gacaagtaat agtcttaccg tcatgcataa 15780
taacgtctcg ttccttcaag aggggttttc cgacatccat aacgacccga agcctcatga 15840
aagcattagg gaagaacttt tggttcttct tgtcatggcc tttataggtg tcagccgagc 15900
tcgccaattc ccgtccgact ggctccgcaa aatattcgaa cggcaagtta tggacttgca 15960
accataactc cacggtattg agcaggacct attgtgaaga ctcatctcat ggagcttcag 16020
aatgtggttg tcagcaaacc aatgaccgaa atccatcaca tgacggacgt ccagtgggtg 16080
agcgaaacga aacaggaagc gcctatcttt cagagtcgtg agctccacac cggattccgg 16140
caactacgtg ttgggcaggc ttcgccgtat tagagatatg ttgaggcaga cccatctgtg 16200
ccactcgtac aattacgaga gttgtttttt ttgtgatttt cctagtttct cgttgatggt 16260
gagctcatat tctacatcgt atggtctctc aacgtcgttt cctgtcatct gatatcccgt 16320
catttgcatc cacgtgcgcc gcctcccgtg ccaagtccct aggtgtcatg cacgccaaat 16380
tggtggtggt gcgggctgcc ctgtgcttct taccgatggg tggaggttga gtttgggggt 16440
ctccgcggcg atggtagtgg gttgacggtt tggtgtgggt tgacggcatt gatcaattta 16500
cttcttgctt caaattcttt ggcagaaaac aattcattag attagaactg gaaaccagag 16560
tgatgagacg gattaagtca gattccaaca gagttacatc tcttaagaaa taatgtaacc 16620
cctttagact ttatatattt gcaattaaaa aaataattta acttttagac tttatatata 16680
gttttaataa ctaagtttaa ccactctatt atttatatcg aaactatttg tatgtctccc 16740

ctctaaataa acttggtatt gtgtttacag aacctataat caaataatca atactcaact 16800

gaagtttgtg cagttaattg aagggattaa cggccaaaat gcactagtat tatcaaccga 16860

atagattcac actagatggc catttccatc aatatcatcg ccgttcttct tctgtccaca 16920

tatccccttct gaaacttgag agacacctgc acttcattgt ccttattacg tgttacaaaa 16980

tgaaacccat gcatccatgc aaactgaaga atggcgcaag aacccttccc ctccatttct 17040

tatgtggcga ccatccattt caccatctcc cgctataaaa caccccccatc acttcaccta 17100

gaacatcatc actacttgct tatccatcca aaagataccc acttttacaa caattaccaa 17160

caacaacaaa caacaaacaa cattacaatt acatttacaa ttaccatacc atgccaccta 17220

gcgctgctaa gcaaatggga gcttctactg gtgttcatgc tggtgttact gactcttctg 17280

ctttcaccag aaaggatgtt gctgatagac ctgatctcac catcgttgga gattctgttt 17340

acgatgctaa ggctttcaga tctgagcatc ctggtggtgc tcatttcgtt tctttgttcg 17400

gaggaagaga tgctactgag gctttcatgg aataccatag aagggcttgg cctaagtcta 17460

gaatgtctag attccacgtt ggatctcttg cttctactga ggaacctgtt gctgctgatg 17520

agggatacct tcaactttgt gctaggatcg ctaagatggt gccttctgtt tcttctggat 17580

tcgctcctgc ttcttactgg gttaaggctg gacttatcct tggatctgct atcgctcttg 17640

aggcttacat gctttacgct ggaaagagac ttctcccttc tatcgttctt ggatggcttt 17700

tcgctcttat cggtcttaac atccagcatg atgctaacca tggtgctttg tctaagtctg 17760

cttctgttaa ccttgctctt ggactttgtc aggattggat cggaggatct atgatccttt 17820

ggcttcaaga gcatgttgtt atgcaccacc tccacactaa cgatgttgat aaggatcctg 17880

atcaaaaggc tcacggtgct cttagactca agcctactga tgcttggtca cctatgcatt 17940

ggcttcagca tctttacctt ttgcctggtg agactatgta cgctttcaag cttttgttcc 18000

tcgacatctc tgagcttgtt atgtggcgtt gggagggtga gcctatctct aagcttgctg 18060

gatacctctt tatgccttct ttgcttctca agcttacctt ctgggctaga ttcgttgctt 18120

tgcctctttа ccttgctcct tctgttcata ctgctgtgtg tatcgctgct actgttatga 18180

ctggatcttt ctacctcgct ttcttcttct tcatctccca caacttcgag ggtgttgctt 18240

ctgttggacc tgatggatct atcacttcta tgactagagg tgctagcttc cttaagagac 18300

aagctgagac ttcttctaac gttggaggac ctcttcttgc tactcttaac ggtggactca 18360

actaccaaat tgagcatcac ttgttcccta gagttcacca tggattctac cctagacttg 18420

ctcctcttgt taaggctgag cttgaggcta gaggaatcga gtacaagcac taccctacta 18480

tctggtctaa ccttgcttct accctcagac atatgtacgc tcttggaaga aggcctagat 18540

ctaaggctga gtaatgacaa gcttatgtga cgtgaaataa taacggtaaa atatatgtaa 18600

taataataat aataaagcca caaagtgaga atgaggggaa ggggaaatgt gtaatgagcc 18660
agtagccggt ggtgctaatt ttgtatcgta ttgtcaataa atcatgaatt ttgtggtttt 18720
tatgtgtttt tttaaatcat gaattttaaa ttttataaaa taatctccaa tcggaagaac 18780
aacattccat atccatgcat ggatgtttct ttacccaaat ctagttcttg agaggatgaa 18840
gcatcaccga acagttctgc aactatcccc caaaagcttt aaaatgaaca acaaggaaca 18900
gagcaacgtt ccaaagatcc caaacgaaac atattatcta tactaatact atattattaa 18960
ttactactgc ccggaatcac aatccctgaa tgattcctat taactacaag ccttgttggc 19020
ggcggagaag tgatcggcgc ggcgagaagc agcggactcg gagacgaggc cttggaagat 19080
ctgagtcgaa cgggcagaat cagtattttc cttcgacgtt aattgatcct acactatgta 19140
ggtcatatcc atcgttttaa tttttggcca ccattcaatt ctgtcttgcc tttagggatg 19200
tgaatatgaa cggccaaggt aagagaataa aaataatcca aattaaagca agagaggcca 19260
agtaagataa tccaaatgta cacttgtcat tgccaaaatt agtaaaatac tcggcatatt 19320
gtattcccac acattattaa aataccgtat atgtattggc tgcatttgca tgaataatac 19380
tacgtgtaag cccaaaagaa cccacgtgta gcccatgcaa agttaacact cacgacccca 19440
ttcctcagtc tccactatat aaacccacca tccccaatct caccaaaccc accacacaac 19500
tcacaactca ctctcacacc ttaaagaacc aatcaccacc aaaaatttta caacaattac 19560
caacaacaac aaacaacaaa caacattaca attacattta caattaccat accatgagcg 19620
ctgttaccgt tactggatct gatcctaaga acagaggatc ttctagcaac acgagcaaag 19680
aggttccaaa agttgctatc gataccaacg gaaacgtgtt ctctgttcct gatttcacca 19740
tcaaggacat ccttggagct atcgctcatg agtgttacga gagaagattg gctacctctc 19800
tctactacgt gttcagagat atcttctgca tgcttaccac cggatacctt acccataaga 19860
tcctttaccc tctcctcatc tcttacacct ctaacagcat catcaagttc actttctggg 19920
ccctttacac ttacgttcaa ggacttttcg gaaccggaat ctgggttctc gctcatgagt 19980
gtggacatca agctttctct gattacggaa tcgtgaacga tttcgttgga tggacccttc 20040
actcttacct tatggttcct tacttcagct ggaagtactc tcatggaaag caccataagg 20100
ctactggaca catgaccaga gatatggttt tcgttcctgc caccaaagag gaattcaaga 20160
agtctaggaa cttcttcggt aacctcgctg agtactctga ggattctcca cttagaaccc 20220
tttacgagct tcttgttcaa caacttggag gatggatcgc ttacctcttc gttaacgtta 20280
caggacaacc ttaccctgat gttccttctt ggaaatggaa ccacttctgg cttacctctc 20340
cacttttcga gcaaagagat gctctctaca tcttcctttc tgatcttgga atcctcaccc 20400
agggaatcgt tcttactctt tggtacaaga aattcggagg atggtccctt ttcatcaact 20460
ggttcgttcc ttacatctgg gttaaccact ggctcgtttt catcacattc cttcagcaca 20520

ctgatcctac tatgcctcat tacaacgctg aggaatggac tttcgctaag ggtgctgctg 20580

ctactatcga tagaaagttc ggattcatcg gacctcacat cttccatgat atcatcgaga 20640

ctcatgtgct tcaccactac tgttctagga tcccattcta caacgctaga cctgcttctg 20700

aggctatcaa gaaagttatg ggaaagcact acaggtctag cgacgagaac atgtggaagt 20760

cactttggaa gtctttcagg tcttgccaat acgttgacgg tgataacggt gttctcatgt 20820

tccgtaacat caacaactgc ggagttggag ctgctgagaa gtaatgaagg ggtgatcgat 20880

tatgagatcg tacaaagaca ctgctaggtg ttaaggatgg ataataataa taataatgag 20940

atgaatgtgt tttaagttag tgtaacagct gtaataaaga gagagagaga gagagagaga 21000

gagagagaga gagagagaga gagagagagg ctgatgaaat gttatgtatg tttcttggtt 21060

tttaaaataa atgaaagcac atgctcgtgt ggttctatcg aattattcgg cggttcctgt 21120

gggaaaaagt ccagaagggc cgccgcagct actactacaa ccaaggccgt ggaggagggc 21180

aacagagcca gcacttcgat agctgctgcg atgatcttaa gcaattgagg agcgagtgca 21240

catgcagggg actggagcgt gcaatcggcc agatgaggca ggacatccag cagcagggac 21300

agcagcagga agttgagagg tggtcccatc aatctaaaca agtcgctagg gaccttccgg 21360

gacagtgcgg cacccagcct agccgatgcc agctccaggg gcagcagcag tctgcatggt 21420

tttgaagtgg tgatcgatga gatcgtataa agacactgct aggtgttaag gatgggataa 21480

taagatgtgt tttaagtcat taaccgtaat aaaaagagag agaggctgat ggaatgttat 21540

gtatgtatgt ttcttggttt ttaaaattaa atggaaagca catgctcgtg tgggttctat 21600

ctcgattaaa aatcccaatt atatttggtc taatttagtt tggtattgag taaaacaaat 21660

tcgaaccaaa ccaaaatata aatatatagt ttttatatat atgcctttaa gacttttat 21720

agaattttct ttaaaaaata tctagaaata tttgcgactc ttctggcatg taatatttcg 21780

ttaaatatga agtgctccat ttttattaac tttaaataat tggttgtacg atcactttct 21840

tatcaagtgt tactaaaatg cgtcaatctc tttgttcttc catattcata tgtcaaaatc 21900

tatcaaaatt cttatatatc tttttcgaat ttgaagtgaa atttcgataa tttaaaatta 21960

aatagaacat atcattattt aggtatcata ttgattttta tacttaatta ctaaatttgg 22020

ttaactttga aagtgtacat caacgaaaaa ttagtcaaac gactaaaata aataaatatc 22080

atgtgttatt aagaaaattc tcctataaga atattttaat agatcatatg tttgtaaaaa 22140

aaattaattt ttactaacac atatatttac ttatcaaaaa tttgacaaag taagattaaa 22200

ataatattca tctaacaaaa aaaaaaccag aaaatgctga aaacccggca aaaccgaacc 22260

aatccaaacc gatatagttg gtttggtttg attttgatat aaaccgaacc aactcggtcc 22320

atttgcaccc ctaatcataa tagctttaat atttcaagat attattaagt taacgttgtc 22380

aatatcctgg aaattttgca aaatgaatca agcctatatg gctgtaatat gaatttaaaa 22440

gcagctcgat gtggtggtaa tatgtaattt acttgattct aaaaaaatat cccaagtatt 22500

aataatttct gctaggaaga aggttagcta cgatttacag caaagccaga atacaaagaa 22560

ccataaagtg attgaagctc gaaatatacg aaggaacaaa tatttttaaa aaaatacgca 22620

atgacttgga acaaaagaaa gtgatatatt ttttgttctt aaacaagcat cccctctaaa 22680

gaatggcagt tttcctttgc atgtaactat tatgctcccc tcgttacaaa aattttggac 22740

tactattggg aacttcttct gaaaatagtc ctgcaggcta gtagattggt tggttggttt 22800

ccatgtacca gaaggcttac cctattagtt gaaagttgaa actttgttcc ctactcaatt 22860

cctagttgtg taaatgtatg tatatgtaat gtgtataaaa cgtagtactt aaatgactag 22920

gagtggttct tgagaccgat gagagatggg agcagaacta aagatgatga cataattaag 22980

aacgaatttg aaaggctctt aggtttgaat cctattcgag aatgtttttg tcaaagatag 23040

tggcgatttt gaaccaaaga aaacatttaa aaaatcagta tccggttacg ttcatgcaaa 23100

tagaaagtgg tctaggatct gattgtaatt ttagacttaa agagtctctt aagattcaat 23160

cctggctgtg tacaaaacta caaataatat attttagact atttggcctt aactaaactt 23220

ccactcatta tttactgagg ttagagaata gacttgcgaa taaacacatt cccgagaaat 23280

actcatgatc ccataattag tcagagggta tgccaatcag atctaagaac acacattccc 23340

tcaaatttta atgcacatgt aatcatagtt tagcacaatt caaaaataat gtagtattaa 23400

agacagaaat ttgtagactt ttttttggcg ttaaaagaag actaagttta tacgtacatt 23460

ttattttaag tggaaaaccg aaattttcca tcgaaatata tgaatttagt atatatattt 23520

ctgcaatgta ctattttgct attttggcaa ctttcagtgg actactactt tattacaatg 23580

tgtatggatg catgagtttg agtatacaca tgtctaaatg catgctttgt aaaacgtaac 23640

ggaccacaaa agaggatcca tacaaataca tctcatagct tcctccatta ttttccgaca 23700

caaacagagc attttacaac aattaccaac aacaacaaac aacaaacaac attacaatta 23760

catttacaat taccatacca tggaatttgc tcaacctctc gttgctatgg ctcaagagca 23820

gtacgctgct atcgatgctg ttgttgctcc tgctatcttc tctgctaccg actctattgg 23880

atggggactc aagcctatct cttctgctac taaggatctc cctctcgttg aatctcctac 23940

ccctcttatc ctttctctcc tcgcttactt cgctatcgtt ggttctggac tcgtttaccg 24000

taaagtgttc cctagaaccg ttaagggaca ggatcctttc cttctcaagg ctcttatgct 24060

cgctcacaac gttttcctta tcggactcag cctttacatg tgcctcaagc tcgtttacga 24120

ggcttacgtg aacaagtact ccttctgggg aaacgcttac aaccctgctc aaaccgagat 24180

ggctaaggtg atctggatct tctacgtgtc caagatctac gagttcatgg acaccttcat 24240

catgcttctc aagggaaacg ttaaccaggt ttccttcctc catgtttacc accacggatc 24300

tatctctgga atctggtgga tgatcactta tgctgctcca ggtggagatg cttacttctc 24360
tgctgctctc aactcttggg ttcatgtgtg catgtacacc tactacttca tggctgctgt 24420
tcttcctaag gacgaaaaga ccaagagaaa gtacctttgg tggggaagat accttaccca 24480
gatgcaaatg ttccagttct tcatgaacct tctccaggct gtttacctcc tctactcttc 24540
ttctccttac cctaagttca ttgctcaact cctcgttgtt tacatggtta ccctcctcat 24600
gcttttcgga aacttctact acatgaagca ccacgcttct aagtgataag ggccgccgcc 24660
atgtgacaga tcgaaggaag aaagtgtaat aagacgactc tcactactcg atcgctagtg 24720
attgtcattg ttatatataa taatgttatc tttcacaact tatcgtaatg catgtgaaac 24780
tataacacat taatcctact tgtcatatga taacactctc cccatttaaa actcttgtca 24840
atttaaagat ataagattct ttaaatgatt aaaaaaaata tattataaat tcaatcactc 24900
ctactaataa attattaatt attatttatt gattaaaaaa atacttatac taatttagtc 24960
tgaatagaat aattagattc tagcctgcag ggcggccgcg gatcccatgg agtcaaagat 25020
tcaaatagag gacctaacag aactcgccgt aaagactggc gaacagttca tacagagtct 25080
cttacgactc aatgacaaga agaaaatctt cgtcaacatg gtggagcacg acacacttgt 25140
ctactccaaa aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa agggcaattg agacttttca 25200
acaaagggta atatccggaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcactttat 25260
tgtgaagata gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa 25320
ggccatcgtt gaagatgcct ctgccgacag tggtcccaaa gatggacccc cacccacgag 25380
gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga 25440
tatctccact gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag acccttcctc 25500
tatataagga agttcatttc atttggagag aacacggggg actgaattaa atatgagccc 25560
tgagaggcgt cctgttgaaa tcagacctgc tactgctgct gatatggctg ctgtttgtga 25620
tatcgtgaac cactacatcg agacttctac cgttaacttc agaactgagc ctcaaactcc 25680
tcaagagtgg atcgatgatc ttgagagact ccaagataga tacccttggc ttgttgctga 25740
ggttgagggt gttgttgctg gaatcgctta cgctggacct tggaaggcta gaaacgctta 25800
cgattggact gttgagtcta ccgtttacgt ttcacacaga catcagagac ttggacttgg 25860
atctaccctt tacactcacc ttctcaagtc tatggaagct cagggattca agtctgttgt 25920
tgctgttatc ggactcccta acgatccttc tgttagactt catgaggctc ttggatacac 25980
tgctagagga actcttagag ctgctggata caagcacggt ggatggcatg atgttggatt 26040
ctggcaaaga gatttcgagc ttcctgctcc tcctagacct gttagaccag ttactcagat 26100
ctgaatttgc gtgatcgttc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt 26160

gccggtcttg cgatgattat catataattt ctgttgaatt acgttaagca tgtaataatt 26220

aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta 26280

tacatttaat acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc 26340

gcggtgtcat ctatgttact agatcactag tgatgtacgg ttaaaaccac ccagtacat 26400

taaaaacgtc cgcaatgtgt tattaagttg tctaagcgtc aatttgttta caccacaata 26460

tatcctgcca ccagccagcc aacagctccc cgaccggcag ctcggcacaa aatcaccact 26520

cgatacaggc agcccatcag tcc 26543

<210> 7

<211> 23760

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de nucleótidos de pGA7- mod_G

<400> 7

tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttca cgccctttta 60

aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120

tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180

tcacgacgtt gtaaaacggg cgcccccgcgg aaagcttgcg gccgcggtac cgcccgttcg 240

actcagatct tccaaggcct cgtctccgag tccgctgctt ctcgccgcgc cgatcacttc 300

tccgccgcca acaaggcttg tagttaatag gaatcattca gggattgtga ttccgggcag 360

tagtaattaa taatatagta ttagtataga taatatgttt cgtttgggat ctttggaacg 420

ttgctctgtt ccttgttgtt cattttaaag cttttgaggg atagttgcag aactgttcgg 480

tgatgcttca tcctctcaag aactagattt gggtaaagaa acatccatgc atggatatgg 540

aatgttgttc ttccgattgg agattatttt ataaaattta aaattcatga tttaaaaaaa 600

cacataaaaa ccacaaaatt catgatttat tgacaatacg atacaaaatt agcaccaccg 660

gctactggct cattacacat ttcccccttcc cctcattctc actttgtggc tttattatta 720

ttattattac atatatttta ccgttattat ttcacgtcac ataagcttgt taattaatta 780

tcactgcttc ttagcaccct tagacttgta cctcttacgg tagaagttgg cgaagagaac 840

gaacatgttc accataaccc agagttgaag gtaaggaagc cagaaagcgg tattctgaac 900

gtaagcggtg tagatagagt gagaagcaca gatacagaac tgaagcatct ggatctgggt 960

gatgtacttc ttccagaaac agttaactcc aagagcagca agtccgtagt aagagtacat 1020

gatcacgtgc acgaaggtgt taacagaaga tccgaagtag caatctccaa caggctcaag 1080

cttcataaca acgaaccatg accagatgag aagagtgtgg tggtagatgt gaaggaaaga 1140

aagctggtcg aacttcttcc tcatcaccat gaagaaggtg tcgagaagct caacgtactt 1200

gttgttgtag tgaagccaga taacctgaga gattccccaa gagttagcag tcatatcagg 1260

gatgtttccc caaaccttaa gtccctgagc cctatgagaa gtaacgaaaa ggtagatgca 1320

gtagctgttg aagaaggtct ggtagaagtt gtaaacgagc atagcgttct tgagtccgaa 1380

aggttgagat ctgttctgca tgatacgctt tccgaagtag atgaagagga ggtatccaat 1440

agttccgata gtaggtcccc agtactcaac ctgcatgaag taagcaggaa ctttctcaga 1500

agctgggata tcagggttag ccacattgta ggtaacgtat ccaagagttc cagcaagagc 1560

agcagggata gcgatagagg ccatggtatg gtaattgtaa atgtaattgt aatgttgttt 1620

gttgtttgtt gttgttggta attgttgtaa aattaattaa gtgggtatct tttggatgga 1680

taagcaagta gtgatgatgt tctaggtgaa gtgatggggg tgttttatag cgggagatgg 1740

tgaaatggat ggtcgccaca taagaaatgg aggggaaggg ttcttgcgcc attcttcagt 1800

ttgcatggat gcatgggttt cattttgtaa cacgtaataa ggacaatgaa gtgcaggtgt 1860

ctctcaagtt tcagagggga tatgtggaca gaagaagaac ggcgatgata ttgatggaaa 1920

tggccatcta gtgtgaatct attcggttga taatactagt gcattttggc cgttaatccc 1980

ttcaattaac tgcacaaact tcagttgagt attgattatt tgattatagg ttctgtaaac 2040

acaataccaa gtttatttag aggggagaca tacaaatagt ttcgatataa ataatagagt 2100

ggttaaactt agttattaaa actatatata aagtctaaaa gttaaattat ttttttaatt 2160

gcaaatatat aaagtctaaa ggggttacat tatttcttaa gagatgtaac tctgttggaa 2220

tctgacttaa tccgtctcat cactctggtt tccagttcta atctaatgaa ttgttttctg 2280

ccaaagaatt tgaagcaaga agtaaattga tcaatgccgt caacccacac caaaccgtca 2340

acccactacc atcgccgcgg agacccccaa actcaacctc cacccatcgg taagaagcac 2400

agggcagccc gcaccaccac caatttggcg tgcatgacac ctagggactt ggcacgggag 2460

gcggcgcacg tggatgcaaa tgacgggata tcagatgaca ggaaacgacg ttgagagacc 2520

atacgatgta gaatatgagc tcaccatcaa cgagaaacta ggaaaatcac aaaaaaaaca 2580

actctcgtaa ttgtacgagt ggcacagatg ggtctgcctc aacatatctc taatacggcg 2640

aagcctgccc aacacgtagt tgccggaatc cggtgtggag ctcacgactc tgaaagatag 2700

gcgcttcctg tttcgtttcg ctcacccact ggacgtccgt catgtgatgg atttcggtca 2760

ttggtttgct gacaaccaca ttctgaagct ccatgagatg agtcttcaca ataggtcctg 2820

ctcaataccg tggagttatg gttgcaagtc cataacttgc cgttcgaata ttttgcggag 2880

ccagtcggac gggaattggc gagctcggct gacacctata aaggccatga caagaagaac 2940

caaaagttct tccctaatgc tttcatgagg cttcgggtcg ttatggatgt cggaaaaccc 3000

ctcttgaagg aacgagacgt tattatgcat gacggtaaga ctattacttg tcagtataag 3060

tatgaaagat tacctgtctt ctgctttgtt tgtggattga ttggacacgt tgaaaaaaaa 3120

tgtgcacttc gatttcaata ctcagagatc gacttccctt ttctctagga gtattcgatc 3180

aaggcattaa catggaagga agctcaagct ctaaaggctt cacaatggaa cctgaaaaat 3240

ttcaacaagc ctaaactgaa atcgaagtca aatcacccaa ccgggagctc taaatcagca 3300

aacactcctc ctccacagta tccaatcatc gtgcacgatg ctccaggtat tgcaagccag 3360

gtattgcaag ctaggagtag gatagagacc ttaaacgtcg ttggtgtgaa gagtcatctt 3420

cagacctaat ggagatagat gtagacggcg gcacgaagac tctgaaacac cagaaaggct 3480

agtccaggat aaggatctgc tatcccaact gacctctcgt tagtcccaag gcctctcaac 3540

tagagcagga ggaaggatgg tcacaagact aggataatga tgtttccaat atgaacctga 3600

atgtccatag ctaatttttt tagtcttgct tctgcacttt ttgtttatta tgttctggtg 3660

actatgttat ttacccttgt ccgtatgctt gagggtaccc tagtagattg gttggttggt 3720

ttccatgtac cagaaggctt accctattag ttgaaagttg aaactttgtt ccctactcaa 3780

ttcctagttg tgtaaatgta tgtatatgta atgtgtataa aacgtagtac ttaaatgact 3840

aggagtggtt cttgagaccg atgagagatg ggagcagaac taaagatgat gacataatta 3900

agaacgaatt tgaaaggctc ttaggtttga atcctattcg agaatgtttt tgtcaaagat 3960

agtggcgatt ttgaaccaaa gaaaacattt aaaaaatcag tatccggtta cgttcatgca 4020

aatagaaagt ggtctaggat ctgattgtaa ttttagactt aaagagtctc ttaagattca 4080

atcctggctg tgtacaaaac tacaaataat atattttaga ctatttggcc ttaactaaac 4140

ttccactcat tatttactga ggttagagaa tagacttgcg aataaacaca ttcccgagaa 4200

atactcatga tcccataatt agtcagaggg tatgccaatc agatctaaga acacacattc 4260

cctcaaattt taatgcacat gtaatcatag tttagcacaa ttcaaaaata atgtagtatt 4320

aaagacagaa atttgtagac tttttttgg cgttaaaaga agactaagtt tatacgtaca 4380

ttttatttta agtggaaaac cgaaattttc catcgaaata tatgaattta gtatatatat 4440

ttctgcaatg tactattttg ctattttggc aactttcagt ggactactac tttattacaa 4500

tgtgtatgga tgcatgagtt tgagtataca catgtctaaa tgcatgcttt gtaaaacgta 4560

acggaccaca aaagaggatc catacaaata catctcatag cttcctccat tattttccga 4620

cacaaacaga gcattttaca acaattacca acaacaacaa acaacaaaca acattacaat 4680

tacatttaca attaccatac catggaattc gcccagcctc ttgttgctat ggctcaagag 4740

caatacgctg ctatcgatgc tgttgttgct cctgctatct tctctgctac tgattctatc 4800

ggatggggac ttaagcctat ctcttctgct actaaggact tgcctcttgt tgagtctcct 4860

acacctctca tcctttcttt gcttgcttac ttcgctatcg ttggatctgg actcgtttac 4920

agaaaggttt tccctagaac cgtgaaggga caagatccat tcctttttgaa ggctcttatg 4980

cttgctcaca acgtgttcct tatcggactt tctctttaca tgtgcctcaa gcttgtgtac 5040

gaggcttacg ttaacaagta ctctttctgg ggaaacgctt acaaccctgc tcaaactgag 5100

atggctaagg ttatctggat cttctacgtg agcaagatct acgagttcat ggataccttc 5160

atcatgctcc tcaagggaaa tgttaaccag gttagcttcc ttcacgttta ccatcacgga 5220

tctatctctg gaatctggtg gatgattact tacgctgctc ctggtggtga tgcttacttc 5280

tctgctgctc ttaactcttg ggttcacgtg tgtatgtaca cctactattt tatggctgcc 5340

gtgcttccta aggacgagaa aactaagaga aagtacctct ggtggggaag ataccttact 5400

caaatgcaga tgttccagtt cttcatgaac cttctccagg ctgtttacct tctctactct 5460

tcatctcctt accctaagtt tatcgctcag ctcctcgtgg tgtacatggt tactcttctc 5520

atgcttttcg gaaacttcta ctacatgaag caccacgcta gcaagtgatg aggcgcgccg 5580

ggccgccgcc atgtgacaga tcgaaggaag aaagtgtaat aagacgactc tcactactcg 5640

atcgctagtg attgtcattg ttatatataa taatgttatc tttcacaact tatcgtaatg 5700

catgtgaaac tataacacat taatcctact tgtcatatga taacactctc cccatttaaa 5760

actcttgtca atttaaagat ataagattct ttaaatgatt aaaaaaaata tattataaat 5820

tcaatcactc ctactaataa attattaatt attatttatt gattaaaaaa atacttatac 5880

taatttagtc tgaatagaat aattagattc tagtctcatc ccctttaaa ccaacttagt 5940

aaacgttttt ttttttaatt ttatgaagtt aagttttac cttgttttta aaaagaatcg 6000

ttcataagat gccatgccag aacattagct acacgttaca catagcatgc agccgcggag 6060

aattgttttt cttcgccact tgtcactccc ttcaaacacc taagagcttc tctctcacag 6120

cacacacata caatcacatg cgtgcatgca ttattacacg tgatcgccat gcaaatctcc 6180

tttatagcct ataaattaac tcatccgctt cactctttac tcaaaccaaa actcatcgat 6240

acaaacaaga ttaaaaacat acacgaggat cttttacaac aattaccaac aacaacaaac 6300

aacaaacaac attacaatta catttacaat taccatacca tgcctccaag ggactcttac 6360

tcttatgctg ctcctccttc tgctcaactt cacgaagttg atactcctca agagcacgac 6420

aagaaagagc ttgttatcgg agatagggct tacgatgtta ccaacttcgt taagagacac 6480

cctggtggaa agatcattgc ttaccaagtt ggaactgatg ctaccgatgc ttacaagcag 6540

ttccatgtta gatctgctaa ggctgacaag atgcttaagt ctcttccttc tcgtcctgtt 6600

cacaagggat actctccaag aagggctgat cttatcgctg atttccaaga gttcaccaag 6660

caacttgagg ctgagggaat gttcgagcct tctcttcctc atgttgctta cagacttgct 6720

gaggttatcg ctatgcatgt tgctggtgct gctcttatct ggcatggata cactttcgct 6780

ggaatcgcta tgcttggagt tgttcaggga agatgtggat ggcttatgca tgagggtgga 6840

cattactctc tcactggaaa cattgctttc gacagagcta tccaagttgc ttgttacgga 6900

cttggatgtg gaatgtctgg tgcttggtgg cgtaaccagc ataacaagca ccatgctact 6960

cctcaaaagc ttcagcacga tgttgatctt gatacccttc ctctcgttgc tttccatgag 7020

agaatcgctg ctaaggttaa gtctcctgct atgaaggctt ggctttctat gcaagctaag 7080

cttttcgctc ctgttaccac tcttcttgtt gctcttggat ggcagcttta ccttcatcct 7140

agacacatgc tcaggactaa gcactacgat gagcttgcta tgctcggaat cagatacgga 7200

cttgttggat accttgctgc taactacggt gctggatacg ttctcgcttg ttaccttctt 7260

tacgttcagc ttggagctat gtacatcttc tgcaacttcg ctgtttctca tactcacctc 7320

cctgttgttg agcctaacga gcatgctact tgggttgagt acgctgctaa ccacactact 7380

aactgttctc catcttggtg gtgtgattgg tggatgtctt accttaacta ccagatcgag 7440

caccaccttt acccttctat gcctcaattc agacacccta agatcgctcc tagagttaag 7500

cagcttttcg agaagcacgg acttcactac gatgttagag gatacttcga ggctatggct 7560

gatactttcg ctaaccttga taacgttgcc catgctcctg agaagaaaat gcagtaatga 7620

gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggtcttgcg 7680

atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcacg taataattaa catgtaatgc 7740

atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 7800

gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct 7860

atgttactag atcgggtcga taaaaatccc aattatattt ggtctaattt agtttggtat 7920

tgagtaaaac aaattcgaac caaaccaaaa tataaatata tagtttttat atatatgcct 7980

ttaagacttt ttatagaatt ttctttaaaa aatatctaga aatatttgcg actcttctgg 8040

catgtaatat ttcgttaaat atgaagtgct ccatttttat taactttaaa taattggttg 8100

tacgatcact ttcttatcaa gtgttactaa aatgcgtcaa tctctttgtt cttccatatt 8160

catatgtcaa aatctatcaa aattcttata tatctttttc gaatttgaag tgaaatttcg 8220

ataatttaaa attaaataga acatatcatt atttaggtat catattgatt tttatactta 8280

attactaaat ttggttaact ttgaaagtgt acatcaacga aaaattagtc aaacgactaa 8340

aataaataaa tatcatgtgt tattaagaaa attctcctat aagaatattt taatagatca 8400

tatgtttgta aaaaaaatta atttttacta acacatatat ttacttatca aaaatttgac 8460

aaagtaagat taaaataata ttcatctaac aaaaaaaaaa ccagaaaatg ctgaaaaccc 8520

ggcaaaaccg aaccaatcca aaccgatata gttggtttgg tttgattttg atataaaccg 8580

aaccaactcg gtccatttgc acccctaatc ataatagctt taatatttca agatattatt 8640

aagttaacgt tgtcaatatc ctggaaattt tgcaaaatga atcaagccta tatggctgta 8700

atatgaattt aaaagcagct cgatgtggtg gtaatatgta atttacttga ttctaaaaaa 8760

atatcccaag tattaataat ttctgctagg aagaaggtta gctacgattt acagcaaagc 8820
cagaatacaa agaaccataa agtgattgaa gctcgaaata tacgaaggaa caaatatttt 8880
taaaaaaata cgcaatgact tggaacaaaa gaaagtgata tatttttgt tcttaaacaa 8940
gcatcccctc taaagaatgg cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgtta 9000
caaaaatttt ggactactat tgggaacttc ttctgaaaat agtgatagaa cccacacgag 9060
catgtgcttt ccatttaatt ttaaaaacca agaaacatac atacataaca ttccatcagc 9120
ctctctctct ttttattacg gttaatgact taaaacacat cttattatcc catccttaac 9180
acctagcagt gtctttatac gatctcatcg atcaccactt caaaaccatg cagactgctg 9240
ctgcccctgg agctggcatc ggctaggctg ggtgccgcac tgtcccggaa ggtccctagc 9300
gacttgttta gattgatggg accacctctc aacttcctgc tgctgtccct gctgctggat 9360
gtcctgcctc atctggccga ttgcacgctc cagtcccctg catgtgcact cgctcctcaa 9420
ttgcttaaga tcatcgcagc agctatcgaa gtgctggctc tgttgccctc ctccacggcc 9480
ttggttgtag tagtagctgc cgccgccctt ctggactttt tcccacagga accgccgaat 9540
aattcgatag aaccacacga gcatgtgctt tcatttattt taaaaaccaa gaaacataca 9600
taacatttca tcagcctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctctc 9660
tctctcttta ttacagctgt tacactaact taaaacacat tcatctcatt attattatta 9720
ttatccatcc ttaacaccta gcagtgtctt tgtacgatct cataatcgat caccccttca 9780
tcaggtatcc ttaggcttca ctccaacgtt gttgcagtta cggaacatgt acacaccatc 9840
atggttctca acgaactggc aagatctcca agttttccaa aggctaaccc acatgttctc 9900
atcggtgtgt ctgtagtgct ctcccataac tttcttgatg cactcggtag cttctctagc 9960
atggtagaat gggatccttg aaacgtagtg atggagcaca tgagtctcga tgatgtcatg 10020
gaagatgatt ccgaggattc cgaactctct atcgatagta gcagcagcac ccttagcgaa 10080
agtccactct tgagcatcgt aatgaggcat agaagaatcg gtgtgctgaa ggaaggtaac 10140
gaaaacaagc cagtggttaa caaggatcca aggacagaac catgtgatga aagtaggcca 10200
gaatccgaaa accttgtaag cggtgtaaac agaagtgagg gtagcaagga ttccaagatc 10260
agaaagaacg atgtaccagt agtccttctt atcgaaaaca gggctagaag gccagtagtg 10320
agacttgaag aacttagaaa caccagggta aggttgtcca gtagcgttag tagcaaggta 10380
aagagaaagt cctccaagct gttggaacaa gagagcgaaa acagagtaga taggagtttc 10440
ctcagcgata tcgtgaaggc tggtaacttg gtgcttctct ttgaattcct cggcggtgta 10500
aggaacgaaa accatatctc tggtcatgtg tccagtagcc ttatggtgct tagcatgaga 10560
gaacttccag ctgaagtaag gaaccataac aagagagtgg agaacccatc caacggtatc 10620

gttaacccat ccgtagttag agaaagcaga atgtccacac tcatgtccaa ggatccagat 10680

tccgaatccg aaacaagaga tagagaacac gtaagcagac caagcagcga atctaaggaa 10740

ttcgttaggg agaagaggga tgtaggtaag tccaacgtaa gcgatagcag agatagccac 10800

gatatctctc accacgtaag acatagactt cacgagagat ctctcgtaac agtgcttagg 10860

gatagcgtca aggatatcct tgatggtgta atctggcacc ttgaaaacgt ttccgaaggt 10920

atcgatagcg gtcttttgct gcttgaaaga tgcaacgttt ccagaacgcc taacggtctt 10980

agtagatccc tcaaggatct cagatccaga cacggtaacc ttagacatgg tatggtaatt 11040

gtaaatgtaa ttgtaatgtt gtttgttgtt tgttgttgtt ggtaattgtt gtaaaatttt 11100

tggtggtgat tggttcttta aggtgtgaga gtgagttgtg agttgtgtgg tgggtttggt 11160

gagattgggg atggtgggtt tatatagtgg agactgagga atggggtcgt gagtgttaac 11220

tttgcatggg ctacacgtgg gttcttttgg gcttacacgt agtattattc atgcaaatgc 11280

agccaataca tatacggtat tttaataatg tgtgggaata caatatgccg agtattttac 11340

taattttggc aatgacaagt gtacatttgg attatcttac ttggcctctc ttgctttaat 11400

ttggattatt tttattctct taccttggcc gttcatattc acatccctaa aggcaagaca 11460

gaattgaatg gtggccaaaa attaaaacga tggatatgac ctacatagtg taggatcaat 11520

taacgtcgaa ggaaaatact gattctctca agcatacgga caagggtaaa taacatagtc 11580

accagaacat aataaacaaa aagtgcagaa gcaagactaa aaaaattagc tatggacatt 11640

caggttcata ttggaaacat cattatccta gtcttgtgac catccttcct cctgctctag 11700

ttgagaggcc ttgggactaa cgagaggtca gttgggatag cagatcctta tcctggacta 11760

gcctttctgg tgtttcagag tcttcgtgcc gccgtctaca tctatctcca ttaggtctga 11820

agatgactct tcacaccaac gacgtttaag gtctctatcc tactcctagc ttgcaatacc 11880

tggcttgcaa tacctggagc atcgtgcacg atgattggat actgtggagg aggagtgttt 11940

gctgatttag agctcccggt tgggtgattt gacttcgatt tcagtttagg cttgttgaaa 12000

tttttcaggt tccattgtga agcctttaga gcttgagctt ccttccatgt taatgccttg 12060

atcgaatact cctagagaaa agggaagtcg atctctgagt attgaaatcg aagtgcacat 12120

tttttttcaa cgtgtccaat caatccacaa acaaagcaga agacaggtaa tctttcatac 12180

ttatactgac aagtaatagt cttaccgtca tgcataataa cgtctcgttc cttcaagagg 12240

ggttttccga catccataac gacccgaagc ctcatgaaag cattagggaa gaacttttgg 12300

ttcttcttgt catggccttt ataggtgtca gccgagctcg ccaattcccg tccgactggc 12360

tccgcaaaat attcgaacgg caagttatgg acttgcaacc ataactccac ggtattgagc 12420

aggacctatt gtgaagactc atctcatgga gcttcagaat gtggttgtca gcaaaccaat 12480

gaccgaaatc catcacatga cggacgtcca gtgggtgagc gaaacgaaac aggaagcgcc 12540

tatctttcag agtcgtgagc tccacaccgg attccggcaa ctacgtgttg ggcaggcttc 12600

gccgtattag agatatgttg aggcagaccc atctgtgcca ctcgtacaat tacgagagtt 12660

gtttttttg tgattttcct agtttctcgt tgatggtgag ctcatattct acatcgtatg 12720

gtctctcaac gtcgtttcct gtcatctgat atcccgtcat ttgcatccac gtgcgccgcc 12780

tcccgtgcca agtccctagg tgtcatgcac gccaaattgg tggtggtgcg ggctgccctg 12840

tgcttcttac cgatgggtgg aggttgagtt tgggggtctc cgcggcgatg gtagtgggtt 12900

gacggtttgg tgtgggttga cggcattgat caatttactt cttgcttcaa attctttggc 12960

agaaaacaat tcattagatt agaactggaa accagagtga tgagacggat taagtcagat 13020

tccaacagag ttacatctct taagaaataa tgtaacccct ttagacttta tatatttgca 13080

attaaaaaaa taatttaact tttagacttt atatatagtt ttaataacta agtttaacca 13140

ctctattatt tatatcgaaa ctatttgtat gtctcccctc taaataaact tggtattgtg 13200

tttacagaac ctataatcaa ataatcaata ctcaactgaa gtttgtgcag ttaattgaag 13260

ggattaacgg ccaaaatgca ctagtattat caaccgaata gattcacact agatggccat 13320

ttccatcaat atcatcgccg ttcttcttct gtccacatat cccctctgaa acttgagaga 13380

cacctgcact tcattgtcct tattacgtgt tacaaaatga aacccatgca tccatgcaaa 13440

ctgaagaatg gcgcaagaac ccttcccctc catttcttat gtggcgacca tccatttcac 13500

catctcccgc tataaaacac ccccatcact tcacctagaa catcatcact acttgcttat 13560

ccatccaaaa gatacccact tttacaacaa ttaccaacaa caacaaacaa caaacaacat 13620

tacaattaca tttacaatta ccataccatg ccacctagcg ctgctaagca aatgggagct 13680

tctactggtg ttcatgctgg tgttactgac tcttctgctt tcaccagaaa ggatgttgct 13740

gatagacctg atctcaccat cgttggagat tctgtttacg atgctaaggc tttcagatct 13800

gagcatcctg gtggtgctca tttcgtttct ttgttcggag gaagagatgc tactgaggct 13860

ttcatggaat accatagaag ggcttggcct aagtctagaa tgtctagatt ccacgttgga 13920

tctcttgctt ctactgagga acctgttgct gctgatgagg gataccttca actttgtgct 13980

aggatcgcta agatggtgcc ttctgtttct tctggattcg ctcctgcttc ttactgggtt 14040

aaggctggac ttatccttgg atctgctatc gctcttgagg cttacatgct ttacgctgga 14100

aagagacttc tcccttctat cgttcttgga tggcttttcg ctcttatcgg tcttaacatc 14160

cagcatgatg ctaaccatgg tgctttgtct aagtctgctt ctgttaacct tgctcttgga 14220

ctttgtcagg attggatcgg aggatctatg atcctttggc ttcaagagca tgttgttatg 14280

caccacctcc acactaacga tgttgataag gatcctgatc aaaaggctca cggtgctctt 14340

agactcaagc ctactgatgc ttggtcacct atgcattggc ttcagcatct ttacctttg 14400

cctggtgaga ctatgtacgc tttcaagctt ttgttcctcg acatctctga gcttgttatg 14460
tggcgttggg agggtgagcc tatctctaag cttgctggat acctctttat gccttctttg 14520
cttctcaagc ttaccttctg ggctagattc gttgctttgc ctctttacct tgctccttct 14580
gttcatactg ctgtgtgtat cgctgctact gttatgactg gatctttcta cctcgctttc 14640
ttcttcttca tctcccacaa cttcgagggt gttgcttctg ttggacctga tggatctatc 14700
acttctatga ctagaggtgc tagcttcctt aagagacaag ctgagacttc ttctaacgtt 14760
ggaggacctc ttcttgctac tcttaacggt ggactcaact accaaattga gcatcacttg 14820
ttccctagag ttcaccatgg attctaccct agacttgctc ctcttgttaa ggctgagctt 14880
gaggctagag gaatcgagta caagcactac cctactatct ggtctaacct tgcttctacc 14940
ctcagacata tgtacgctct tggaagaagg cctagatcta aggctgagta atgacaagct 15000
tatgtgacgt gaaataataa cggtaaaata tatgtaataa taataataat aaagccacaa 15060
agtgagaatg aggggaaggg gaaatgtgta atgagccagt agccggtggt gctaattttg 15120
tatcgtattg tcaataaatc atgaattttg tggtttttat gtgttttttt aaatcatgaa 15180
ttttaaattt tataaaataa tctccaatcg gaagaacaac attccatatc catgcatgga 15240
tgtttcttta cccaaatcta gttcttgaga ggatgaagca tcaccgaaca gttctgcaac 15300
tatccctcaa aagctttaaa atgaacaaca aggaacagag caacgttcca aagatcccaa 15360
acgaaacata ttatctatac taatactata ttattaatta ctactgcccg gaatcacaat 15420
ccctgaatga ttcctattaa ctacaagcct tgttggcggc ggagaagtga tcggcgcggc 15480
gagaagcagc ggactcggag acgaggcctt ggaagatctg agtcgaacgg gcagaatcag 15540
tattttcctt cgacgttaat tgatcctaca ctatgtaggt catatccatc gttttaattt 15600
ttggccacca ttcaattctg tcttgccttt agggatgtga atatgaacgg ccaaggtaag 15660
agaataaaaa taatccaaat taaagcaaga gaggccaagt aagataatcc aaatgtacac 15720
ttgtcattgc caaaattagt aaaatactcg gcatattgta ttcccacaca ttattaaaat 15780
accgtatatg tattggctgc atttgcatga ataatactac gtgtaagccc aaaagaaccc 15840
acgtgtagcc catgcaaagt taacactcac gaccccattc ctcagtctcc actatataaa 15900
cccaccatcc ccaatctcac caaacccacc acacaactca caactcactc tcacacctta 15960
aagaaccaat caccaccaaa aattttacaa caattaccaa caacaacaaa caacaaacaa 16020
cattacaatt acatttacaa ttaccatacc atgagcgctg ttaccgttac tggatctgat 16080
cctaagaaca gaggatcttc tagcaacacc gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat 16140
accaacggaa acgtgttctc tgttcctgat ttcaccatca aggacatcct tggagctatc 16200
cctcatgagt gttacgagag aagattggct acctctctct actacgtgtt cagagatatc 16260
ttctgcatgc ttaccaccgg ataccttacc cataagatcc tttaccctct cctcatctct 16320

tacacctcta acagcatcat caagttcact ttctgggccc tttacactta cgttcaagga 16380
cttttcggaa ccggaatctg ggttctcgct catgagtgtg gacatcaagc tttctctgat 16440
tacggaatcg tgaacgattt cgttggatgg acccttcact cttaccttat ggttccttac 16500
ttcagctgga agtactctca tggaaagcac cataaggcta ctggacacat gaccagagat 16560
atggttttcg ttcctgccac caaagaggaa ttcaagaagt ctaggaactt cttcggtaac 16620
ctcgctgagt actctgagga ttctccactt agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa 16680
cttggaggat ggatcgctta cctcttcgtt aacgttacag gacaacctta ccctgatgtt 16740
ccttcttgga aatggaacca cttctggctt acctctccac ttttcgagca aagagatgct 16800
ctctacatct tcctttctga tcttggaatc ctcacccagg gaatcgttct tactctttgg 16860
tacaagaaat tcggaggatg gtccctttc atcaactggt tcgttcctta catctgggtt 16920
aaccactggc tcgttttcat cacattcctt cagcacactg atcctactat gcctcattac 16980
aacgctgagg aatggacttt cgctaagggt gctgctgcta ctatcgatag aaagttcgga 17040
ttcatcggac ctcacatctt ccatgatatc atcgagactc atgtgcttca ccactactgt 17100
tctaggatcc cattctacaa cgctagacct gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga 17160
aagcactaca ggtctagcga cgagaacatg tggaagtcac tttggaagtc tttcaggtct 17220
tgccaatacg ttgacggtga taacggtgtt ctcatgttcc gtaacatcaa caactgcgga 17280
gttggagctg ctgagaagta atgaaggggt gatcgattat gagatcgtac aaagacactg 17340
ctaggtgtta aggatggata ataataataa taatgagatg aatgtgtttt aagttagtgt 17400
aacagctgta ataaagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag 17460
agagaggctg atgaaatgtt atgtatgttt cttggttttt aaaataaatg aaagcacatg 17520
ctcgtgtggt tctatcgaat tattcggcgg ttcctgtggg aaaaagtcca gaagggccgc 17580
cgcagctact actacaacca aggccgtgga ggagggcaac agagccagca cttcgatagc 17640
tgctgcgatg atcttaagca attgaggagc gagtgcacat gcaggggact ggagcgtgca 17700
atcggccaga tgaggcagga catccagcag cagggacagc agcaggaagt tgagaggtgg 17760
tcccatcaat ctaaacaagt cgctagggac cttccgggac agtgcggcac ccagcctagc 17820
cgatgccagc tccaggggca gcagcagtct gcatggtttt gaagtggtga tcgatgagat 17880
cgtataaaga cactgctagg tgttaaggat gggataataa gatgtgtttt aagtcattaa 17940
ccgtaataaa aagagagaga ggctgatgga atgttatgta tgtatgtttc ttggttttta 18000
aaattaaatg gaaagcacat gctcgtgtgg gttctatctc gattaaaaat cccaattata 18060
tttggtctaa tttagtttgg tattgagtaa aacaaattcg aaccaaacca aaatataaat 18120
atatagtttt tatatatatg cctttaagac tttttataga attttcttta aaaaatatct 18180

agaaatattt gcgactcttc tggcatgtaa tatttcgtta aatatgaagt gctccatttt 18240

tattaacttt aaataattgg ttgtacgatc actttcttat caagtgttac taaaatgcgt 18300

caatctcttt gttcttccat attcatatgt caaaatctat caaaattctt atatatcttt 18360

ttcgaatttg aagtgaaatt tcgataattt aaaattaaat agaacatatc attatttagg 18420

tatcatattg atttttatac ttaattacta aatttggtta actttgaaag tgtacatcaa 18480

cgaaaaatta gtcaaacgac taaaataaat aaatatcatg tgttattaag aaaattctcc 18540

tataagaata ttttaataga tcatatgttt gtaaaaaaaa ttaattttta ctaacacata 18600

tatttactta tcaaaaattt gacaaagtaa gattaaaata atattcatct aacaaaaaaa 18660

aaaccagaaa atgctgaaaa cccggcaaaa ccgaaccaat ccaaaccgat atagttggtt 18720

tggtttgatt ttgatataaa ccgaaccaac tcggtccatt tgcaccccta atcataatag 18780

ctttaatatt tcaagatatt attaagttaa cgttgtcaat atcctggaaa ttttgcaaaa 18840

tgaatcaagc ctatatggct gtaatatgaa tttaaaagca gctcgatgtg gtggtaatat 18900

gtaatttact tgattctaaa aaaatatccc aagtattaat aatttctgct aggaagaagg 18960

ttagctacga tttacagcaa agccagaata caaagaacca taaagtgatt gaagctcgaa 19020

atatacgaag gaacaaatat ttttaaaaaa atacgcaatg acttggaaca aaagaaagtg 19080

atatattttt tgttcttaaa caagcatccc ctctaaagaa tggcagtttt cctttgcatg 19140

taactattat gctcccttcg ttacaaaaat tttggactac tattgggaac ttcttctgaa 19200

aatagtcctg caggctagta gattggttgg ttggtttcca tgtaccagaa ggcttaccct 19260

attagttgaa agttgaaact ttgttcccta ctcaattcct agttgtgtaa atgtatgtat 19320

atgtaatgcg tataaaacgt agtacttaaa tgactaggag tggttcttga gaccgatgag 19380

agatgggagc agaactaaag atgatgacat aattaagaac gaatttgaaa ggctcttagg 19440

tttgaatcct attcgagaat gtttttgtca aagatagtgg cgattttgaa ccaaagaaaa 19500

catttaaaaa atcagtatcc ggttacgttc atgcaaatag aaagtggtct aggatctgat 19560

tgtaatttta gacttaaaga gtctcttaag attcaatcct ggctgtgtac aaaactacaa 19620

ataatatatt ttagactatt tggccttaac taaacttcca ctcattattt actgaggtta 19680

gagaatagac ttgcgaataa acacattccc gagaaatact catgatccca taattagtca 19740

gagggtatgc caatcagatc taagaacaca cattccctca aattttaatg cacatgtaat 19800

catagtttag cacaattcaa aaataatgta gtattaaaga cagaaatttg tagacttttt 19860

tttggcgtta aaggaagact aagtttatac gtacatttta ttttaagtgg aaaaccgaaa 19920

ttttccatcg aaatatatga atttagtata tatatttctg caatgtacta ttttgctatt 19980

ttggcaactt tcagtggact actactttat tacaatgtgt atggatgcat gagtttgagt 20040

atacacatgt ctaaatgcat gctttgcaaa acgtaacgga ccacaaaaga ggatccatgc 20100

aaatacatct catagcttcc tccattattt tccgacacaa acagagcaga ctctagagga 20160

tccccccgtt ttacaacaat taccaacaac aacaaaacaac aaacaacatt acaattacat 20220

ttacaattac catcccaaat cggcgcgcca tgtgtcctcc taagaccgat ggaagatctt 20280

ctcctagatc tcctctcacc aggtctaagt catctgctga ggctcttgat gctaaggatg 20340

cttctaccgc tcctgttgat cttaagaccc ttgagcctca tgaacttgct gctaccttcg 20400

agactagatg ggttagggtt gaggatgttg agtacgacgt gaccaacttc aaacatcctg 20460

gtggaagcgt gatcttctac atgcttgcta acactggtgc tgatgctact gaggctttca 20520

aagaatttca catgcgtagc ctcaaggctt ggaagatgct tagagctttg ccttctagac 20580

ctgctgagat caagagatct gagtctgagg atgctcctat gcttgaggat ttcgctaggt 20640

ggagagctga acttgagagg gacggattct tcaagccttc tatcacccat gttgcttacc 20700

gtcttttgga gcttcttgct actttcgctc ttggaaccgc tcttatgtac gctggatacc 20760

ctatcattgc tagcgttgtg tacggtgctt tcttcggagc tagatgtgga tgggttcaac 20820

atgagggtgg acacaactct cttaccggat ctgtgtacgt ggataagaga cttcaggcta 20880

tgacttgcgg attcggactt tctaccagcg gagagatgtg gaaccagatg cataacaagc 20940

accatgctac ccctcagaaa gttagacacg acatggatct tgataccact cctgctgtgg 21000

ctttcttcaa caccgctgtg gaggataata gacctagggg attctctaga gcttgggcta 21060

gacttcaagc ttggaccttc gttcctgtta cttctggact tctcgttcag gctttctgga 21120

tctacgttct ccatcctaga caggtgctca ggaagaagaa ctacgaggaa gcttcttgga 21180

tgctcgtttc tcacgttgtt agaaccgctg ttatcaagct tgctaccgga tactcttggc 21240

ctgttgctta ctggtggttc actttcggaa actggatcgc ttacatgtac ctcttcgctc 21300

acttctctac ttctcacact cacctccctg ttgttccatc tgacaagcac cttagctggg 21360

ttaactacgc tgttgatcac accgttgaca tcgatccttc tcgtggatac gttaactggc 21420

ttatgggata ccttaactgc caggttatcc accatctctt ccctgatatg cctcaattca 21480

gacagcctga ggtgtcaaga agattcgtcc ctttcgctaa gaagtgggga ctcaactaca 21540

aggtgctctc ttactacggt gcttggaagg ctactttcag caacctcgac aaagttggac 21600

agcactacta cgttaacgga aaggctgaga aggctcactg atgattaatt aaatttgggc 21660

tcgaaccggt tcgagcaagc ttatgtgacg tgaaataata acggtaaaat atatgtaata 21720

ataataataa taaagccaca aagtgagaat gaggggaagg ggaaatgtgt aatgagccag 21780

tagccggtgg tgctaatttt gtatcgtatt gtcaataaat catgaatttt gtggttttta 21840

tgtgtttttt taaatcatga attttaaatt ttataaaata atctccaatc ggaagaacaa 21900

cattccatat ccatgcatgg atgtttcttt acccaaatct agttcttgag aggatgaagc 21960

atcaccgaac agttctgcaa ctatccctca aaagctttaa aatgaacaac aaggaacaga 22020

gcaacgttcc aaagatccca aacgaaacat attatctata ctaatactat attattaatt 22080

actactgccc ggaatcacaa tccctgaatg attcctatta actacaagcc ttgttggcgg 22140

cggagaagtg atcggcgcgg cgagaagcag cggactcgga gacgaggcct tggaagatct 22200

cctgcagggc ggccgcggat cccatggagt caaagattca aatagaggac ctaacagaac 22260

tcgccgtaaa gactggcgaa cagttcatac agagtctctt acgactcaat gacaagaaga 22320

aaatcttcgt caacatggtg gagcacgaca cacttgtcta ctccaaaaat atcaaagata 22380

cagtctcaga agaccaaagg gcaattgaga cttttcaaca aagggtaata tccggaaacc 22440

tcctcggatt ccattgccca gctatctgtc actttattgt gaagatagtg gaaaaggaag 22500

gtggctccta caaatgccat cattgcgata aaggaaaggc catcgttgaa gatgcctctg 22560

ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg 22620

ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg 22680

acgcacaatc ccactatcct tcgcaagacc cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt 22740

tggagagaac acgggggact gaattaaata tgagccctga gaggcgtcct gttgaaatca 22800

gacctgctac tgctgctgat atggctgctg tttgtgatat cgtgaaccac tacatcgaga 22860

cttctaccgt taacttcaga actgagcctc aaactcctca agagtggatc gatgatcttg 22920

agagactcca agatagatac ccttggcttg ttgctgaggt tgagggtgtt gttgctggaa 22980

tcgcttacgc tggaccttgg aaggctagaa acgcttacga ttggactgtt gagtctaccg 23040

tttacgtttc acacagacat cagagacttg gacttggatc taccctttac actcaccttc 23100

tcaagtctat ggaagctcag ggattcaagt ctgttgttgc tgttatcgga ctccctaacg 23160

atccttctgt tagacttcat gaggctcttg gatacactgc tagaggaact cttagagctg 23220

ctggatacaa gcacggtgga tggcatgatg ttggattctg gcaaagagat ttcgagcttc 23280

ctgctcctcc tagacctgtt agaccagtta ctcagatctg aatttgcgtg atcgttcaaa 23340

catttggcaa taaagtttct taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgcga tgattatcat 23400

ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt 23460

tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa 23520

caaaatatag cgcgcaaact aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga 23580

tcactagtga tgtacggtta aaaccacccc agtacattaa aaacgtccgc aatgtgttat 23640

taagttgtct aagcgtcaat ttgtttacac cacaatatat cctgccacca gccagccaac 23700

agctccccga ccggcagctc ggcacaaaat caccactcga tacaggcagc ccatcagtcc 23760

<211> 11042

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>
<223> Sequência de nucleótidos de pORE04+11ABGBEC_Cowpea_EPA_insert

<400> 8

tcctgtggtt ggcatgcaca tacaaatgga cgaacggata aacctttca cgccctttta 60

aatatccgat tattctaata aacgctcttt tctcttaggt ttacccgcca atatatcctg 120

tcaaacactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgctagtg gatctcccag 180

tcacgacgtt gtaaaacggg cgccctagaa tctaattatt ctattcagac taaattagta 240

taagtatttt tttaatcaat aaataataat taataattta ttagtaggag tgattgaatt 300

tataatatat ttttttaat catttaaaga atcttatatc tttaaattga caagagtttt 360

aaatggggag agtgttatca tatcacaagt aggattaatg tgttatagtt tcacatgcat 420

tacgataagt tgtgaaagat aacattatta tatataacaa tgacaatcac tagcgatcga 480

gtagtgagag tcgtcttatt acactttctt ccttcgatct gtcacatggc ggcggcccga 540

attctcatca cttagaagcg tggtgcttca tgtagtagaa gtttccgaaa agcatgagaa 600

gagtcaccat gtacaccacg aggagctgag cgataaactt agggtaaggt gaagaagagt 660

agaggaggta cacagcctgg agaaggttca tgaagaactg gaacatttgc atctgggtga 720

ggtatcttcc ccaccagagg tactttctct tagttttctc atccttaggg agcacagcag 780

ccataaagta gtaggtgtac atgcacacgt gcacccaaga gttgagagca gcagagaaat 840

aagcatcacc acctggagca gcgtaggtga tcatccacca gattccagag atagatccgt 900

gatggtacac gtggaggaat gacacctggt tcacatttcc cttgaggagc atgatgaagg 960

tatccatgaa ctcgtagatc tttgacacgt agaaaatcca gatcaccttа gccatctcgg 1020

tctgagcagg gttgtaagcg tttccccaga aagagtactt gttcacgtaa gcctcgtaca 1080

cgagcttgag gcacatgtag agtgagagtc cgatgaggaa cacgttatga gcgagcatga 1140

gagccttgag caagaatgga tcctgtccct tcacagttct agggaacacc tttctgtaca 1200

cgagtccaga tcccacgata gcgaagtaag cgaggagaga caagataaga ggggtaggag 1260

attccacgag agggagatcc ttagtagcag aagagatagg cttgagtccc catccgatag 1320

aatcggtagc agagaagata gcaggagcca caacagcatc gatagcagcg tattgttctt 1380

gagccatagc cacgagaggc tgagcaaatt ccatgaattc tgttcttctt tactctttgt 1440

gtgactgagg tttggtctag tgctttggtc atctatatat aatgataaca acaatgagaa 1500

caagctttgg agtgatcgga gggtctagga tacatgagat tcaagtggac taggatctac 1560

accgttggat tttgagtgtg gatatgtgtg aggttaattt tacttggtaa cggccacaaa 1620

ggcctaagga gaggtgttga gacccttatc ggcttgaacc gctggaataa tgccacgtgg 1680

aagataattc catgaatctt atcgttatct atgagtgaaa ttgtgtgatg gtggagtggt 1740

gcttgctcat tttacttgcc tggtggactt ggcccctttcc ttatggggaa tttatatttt 1800

acttactata gagctttcat acctttttttt taccttggat ttagttaata tataatggta 1860

tgattcatga ataaaaatgg gaaatttttg aatttgtact gctaaatgca taagattagg 1920

tgaaactgtg gaatatatat ttttttcatt taaaagcaaa atttgccttt tactagaatt 1980

ataaatatag aaaaatatat aacattcaaa taaaaatgaa aataagaact ttcaaaaaac 2040

agaactatgt ttaatgtgta aagattagtc gcacatcaag tcatctgtta caatatgtta 2100

caacaagtca taagcccaac aaagttagca cgtctaaata aactaaagag tccacgaaaa 2160

tattacaaat cataagccca acaaagttat tgatcaaaaa aaaaaaacgc ccaacaaagc 2220

taaacaaagt ccaaaaaaaa cttctcaagt ctccatcttc ctttatgaac attgaaaact 2280

atacacaaaa caagtcagat aaatctcttt ctgggcctgt cttcccaacc tcctacatca 2340

cttccctatc ggattgaatg ttttacttgt acctttccg ttgcaatgat attgatagta 2400

tgtttgtgaa aactaatagg gttaacaatc gaagtcatgg aatatggatt tggtccaaga 2460

ttttccgaga gctttctagt agaaagccca tcaccagaaa tttactagta aaataaatca 2520

ccaattaggt ttcttattat gtgccaaatt caatataatt atagaggata tttcaaatga 2580

aaacgtatga atgttattag taaatggtca ggtaagacat taaaaaaatc ctacgtcaga 2640

tattcaactt taaaaattcg atcagtgtgg aattgtacaa aaatttggga tctactatat 2700

atatataatg ctttacaaca cttggatttt tttttggagg ctggaatttt taatctacat 2760

atttgttttg gccatgcacc aactcattgt ttagtgtaat actttgattt tgtcaaatat 2820

atgtgttcgt gtatatttgt ataagaattt ctttgaccat atacacacac acatatatat 2880

atatatatat atattatata tcatgcactt ttaattgaaa aaataatata tatatatata 2940

gtgcattttt tctaacaacc atatatgttg cgattgatct gcaaaaatac tgctagagta 3000

atgaaaaata taatctattg ctgaaattat ctcagatgtt aagattttct taaagtaaat 3060

tctttcaaat tttagctaaa agtcttgtaa taactaaaga ataatacaca atctcgacca 3120

cggaaaaaaa acacataata aatttggggc ccctagaatc taattattct attcagacta 3180

aattagtata agtatttttt taatcaataa ataataatta ataatttatt agtaggagtg 3240

attgaattta taatatattt tttttaatca tttaaagaat cttatatctt taaattgaca 3300

agagttttaa atggggagag tgttatcata tcacaagtag gattaatgtg ttatagtttc 3360

acatgcatta cgataagttg tgaaagataa cattattata tataacaatg acaatcacta 3420

gcgatcgagt agtgagagtc gtcttattac actttcttcc ttcgatctgt cacatggcgg 3480

cggcccgcgg ccgctcatca gtgagccttc tcagcctttc cgttcacgta gtagtgctgt 3540

cccaccttat cgaggtttga gaaggtagcc ttccaagcac cgtagtaaga gagcaccttg 3600

tagttgagtc cccacttctt agcgaaagga acgaatcttc ttgacacctc aggctgtctg 3660

aactgtggca tatctgggaa gaggtgatgg atcacctggc agttgaggta tcccatgagc 3720

cagttcacgt aacccctaga aggatcgata tccacggtgt gatccacagc gtagttcacc 3780

caagaaaggt gcttatcaga tggcaccact gggagatggg tatgagaggt agagaagtga 3840

gcgaagaggt acatgtaagc gatccagttt ccgaaggtga accaccaata agcaacaggc 3900

caagagtatc cggtagcgag cttgataaca gcggttctca caacgtgaga cacgagcatc 3960

caagaagcct cttcgtagtt cttctttctg agcacctgtc taggatggag aacgtagatc 4020

cagaaagcct gcacgagaag tccagaagtc acaggaacga aagtccaagc ctgaagtcta 4080

gcccaagctc tagaaaatcc cctaggcctg ttatcctcaa cagcggtgtt gaagaaagcc 4140

acagcaggag tggtatcgag atccatatca tgcctcacct tttgtggggt tgcgtggtgc 4200

ttgttgtgca tctggttcca catctcacca gaggtagaaa gtccgaatcc gcaagtcata 4260

gcctggagcc tcttatccac atacacagat ccggtgagag agttatgacc accctcgtgt 4320

tgaacccatc cacatctagc tccgaagaaa gcaccgtaca ccacagaagc gataataggg 4380

tatccagcat acatgagagc agttccgaga gcgaaagtag caagaagctc gagaagtctg 4440

tatgccacgt gggtgataga aggcttgaag aatccatccc tctcaagctc agctctccac 4500

ctagcgaaat cttcgagcat aggagcatcc tcagactcag acctcttgat ctcagctggt 4560

ctagaaggca aagccctaag catcttccaa gccttgagag atctcatgtg aaattctttg 4620

aaagcctcag tagcatcagc accggtgtta gcgagcatgt agaagatcac agaaccacca 4680

gggtgcttga agttagtaac atcgtactca acatcctcaa ctctcaccca tctagtctcg 4740

aaggtagcag ccaactcatg aggctcaaga gtcttgagat ccacaggagc agtagaagca 4800

tccttagcat cgagagcctc agcagatgac ttagacctgg taagaggtga cctaggagaa 4860

gatcttccat cagtctttgg agggcacatg cggccgctgt tcttctttac tctttgtgtg 4920

actgaggttt ggtctagtgc tttggtcatc tatatataat gataacaaca atgagaacaa 4980

gctttggagt gatcggaggg tctaggatac atgagattca agtggactag gatctacacc 5040

gttggatttt gagtgtggat atgtgtgagg ttaattttac ttggtaacgg ccacaaaggc 5100

ctaaggagag gtgttgagac ccttatcggc ttgaaccgct ggaataatgc cacgtggaag 5160

ataattccat gaatcttatc gttatctatg agtgaaattg tgtgatggtg gagtggtgct 5220

tgctcatttt acttgcctgg tggacttggc cctttcctta tggggaattt atattttact 5280

tactatagag ctttcatacc tttttttttac cttggattta gttaatatat aatggtatga 5340

ttcatgaata aaaatgggaa atttttgaat ttgtactgct aaatgcataa gattaggtga 5400

aactgtggaa tatatatttt tttcatttaa aagcaaaatt tgccttttac tagaattata 5460

aatatagaaa aatatataac attcaaataa aaatgaaaat aagaactttc aaaaaacaga 5520
actatgttta atgtgtaaag attagtcgca catcaagtca tctgttacaa tatgttacaa 5580
caagtcataa gcccaacaaa gttagcacgt ctaaataaac taaagagtcc acgaaaatat 5640
tacaaatcat aagcccaaca aagttattga tcaaaaaaaa aaaacgccca acaaagctaa 5700
acaaagtcca aaaaaaactt ctcaagtctc catcttcctt tatgaacatt gaaaactata 5760
cacaaaacaa gtcagataaa tctctttctg ggcctgtctt cccaacctcc tacatcactt 5820
ccctatcgga ttgaatgttt tacttgtacc ttttccgttg caatgatatt gatagtatgt 5880
ttgtgaaaac taatagggtt aacaatcgaa gtcatggaat atggatttgg tccaagattt 5940
tccgagagct ttctagtaga aagcccatca ccagaaattt actagtaaaa taaatcacca 6000
attaggtttc ttattatgtg ccaaattcaa tataattata gaggatattt caaatgaaaa 6060
cgtatgaatg ttattagtaa atggtcaggt aagacattaa aaaaatccta cgtcagatat 6120
tcaactttaa aaattcgatc agtgtggaat tgtacaaaaa tttgggatct actatatata 6180
tataatgctt tacaacactt ggatttttt ttggaggctg gaatttttaa tctacatatt 6240
tgttttggcc atgcaccaac tcattgttta gtgtaatact ttgattttgt caaatatatg 6300
tgttcgtgta tatttgtata agaatttctt tgaccatata cacacacaca tatatatata 6360
tatatatata ttatatatca tgcacttta attgaaaaaa taatatatat atatatagtg 6420
catttttct aacaaccata tatgttgcga ttgatctgca aaaatactgc tagagtaatg 6480
aaaaatataa tctattgctg aaattatctc agatgttaag attttcttaa agtaaattct 6540
ttcaaatttt agctaaaagt cttgtaataa ctaaagaata atacacaatc tcgaccacgg 6600
aaaaaaaaca cataataaat ttgggcgcgc cgcgtattgg ctagagcagc ttgccaacat 6660
ggtggagcac gacactctcg tctactccaa gaatatcaaa gatacagtct cagaagacca 6720
aagggctatt gagacttttc aacaaagggt aatatcggga aacctcctcg gattccattg 6780
cccagctatc tgtcacttca tcaaaaggac agtagaaaag gaaggtggca cctacaaatg 6840
ccatcattgc gataaaggaa aggctatcgt tcaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa 6900
agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 6960
aaagcaagtg gattgatgtg ataacatggt ggagcacgac actctcgtct actccaagaa 7020
tatcaaagat acagtctcag aagaccaaag ggctattgag acttttcaac aaagggtaat 7080
atcgggaaac ctcctcggat tccattgccc agctatctgt cacttcatca aaaggacagt 7140
agaaaaggaa ggtggcacct acaaatgcca tcattgcgat aaaggaaagg ctatcgttca 7200
agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggaccccca cccacgagga gcatcgtgga 7260
aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatgtgata tctccactga 7320
cgtaagggat gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac cttcctctat ataaggaagt 7380

tcatttcatt tggagaggac acgctgaaat caccagtctc tctctacaaa tctatctctg 7440

cgatcgcatg cctcctaggg attcttactc ttacgctgct cctccatctg ctcagctcca 7500

tgaagttgat actcctcaag agcacgataa gaaagaactc gtgatcggag atagggctta 7560

cgatgtgacc aacttcgtga agagacaccc tggtggaaag attatcgctt accaggttgg 7620

aactgatgct accgatgctt acaagcagtt ccacgtgaga tctgctaagg ctgataagat 7680

gctcaagtct ctcccatcta ggcctgtgca caagggatat tctccaagaa gggctgatct 7740

tatcgctgat ttccaagagt tcaccaagca gcttgaggct gagggaatgt tcgaaccttc 7800

tctccctcat gtggcttaca gactcgctga ggttatcgct atgcatgttg ctggtgctgc 7860

tctcatctgg cacggatata ctttcgctgg aatcgctatg ctcggagtgg ttcagggaag 7920

atgtggatgg cttatgcatg agggtggaca ctactctctc accggaaaca ttgctttcga 7980

tagggctatc caggtggcat gctatggact tggatgtgga atgtctggtg cttggtggag 8040

aaaccagcat aacaagcacc atgctacccc tcaaaagctc cagcatgatg tggatctcga 8100

tactctccct ctcgtggctt tccatgagag aatcgctgct aaggtgaagt ctcctgctat 8160

gaaggcttgg ctctctatgc aggctaagct tttcgctcct gtgactactc ttctcgttgc 8220

tcttggatgg cagctctacc tccatcctag acacatgctc aggaccaagc actacgatga 8280

gcttgctatg ctcggtatca gatacggact cgttggatac ctcgctgcta attacggtgc 8340

tggatacgtt ctcgcttgct accttcttta cgttcagctc ggagctatgt acatcttctg 8400

caacttcgct gtgtctcaca ctcatctccc tgtggttgaa cctaacgagc atgctacttg 8460

ggttgagtac gctgctaacc acactaccaa ctgctctcca tcttggtggt gtgattggtg 8520

gatgtcttac ctcaactacc agatcgagca ccacctctac ccttctatgc ctcagttcag 8580

acaccctaag atcgctccta gagtgaagca gcttttcgag aagcacggac tccactacga 8640

tgtgagagga tactttgagg ctatggctga taccttcgct aacctcgata atgtggctca 8700

cgctcctgag aagaaaatgc agtgatgagc gatcgcgatc gttcaaacat ttggcaataa 8760

agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg 8820

aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt 8880

tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc 8940

gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt tactagatcc ctgcagggcg 9000

tattggctag agcagcttgc caacatggtg gagcacgaca ctctcgtcta ctccaagaat 9060

atcaaagata cagtctcaga agaccaaagg gctattgaga cttttcaaca aagggtaata 9120

tcgggaaacc tcctcggatt ccattgccca gctatctgtc acttcatcaa aaggacagta 9180

gaaaaggaag gtggcaccta caaatgccat cattgcgata aaggaaaggc tatcgttcaa 9240

gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa 9300
aaagaagacg ttccaaccac gtcttcaaag caagtggatt gatgtgataa catggtggag 9360
cacgacactc tcgtctactc caagaatatc aaagatacag tctcagaaga ccaaagggct 9420
attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcg ggaaacctcc tcggattcca ttgcccagct 9480
atctgtcact tcatcaaaag gacagtagaa aaggaaggtg gcacctacaa atgccatcat 9540
tgcgataaag gaaaggctat cgttcaagat gcctctgccg acagtggtcc caaagatgga 9600
cccccaccca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc caaccacgtc ttcaaagcaa 9660
gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatccca ctatccttcg 9720
caagaccttc ctctatataa ggaagttcat ttcatttgga gaggacacgc tgaaatcacc 9780
agtctctctc tacaaatcta tctctctcga gatgattgaa caagatggat tgcacgcagg 9840
ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg 9900
ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg aggccggttc tttttgtcaa 9960
gaccgacctg tccggtgccc tgaatgaact tcaagacgag gcagcgcggc tatcgtggct 10020
ggccacgacg ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga 10080
ctggctgcta ttgggcgaag tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc 10140
cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggctg catacgcttg atccggctac 10200
ctgcccattc gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc 10260
cggtcttgtc gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact 10320
gttcgccagg ctcaaggcgc gcatgcccga cggcgaggat ctcgtcgtga ctcatggcga 10380
tgcctgcttg ccgaatatca tggtggaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg 10440
ccggctgggt gtggcggacc gctatcagga catagcgttg gctacccgtg atattgctga 10500
agagcttggc ggcgaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga 10560
ttcgcagcgc atcgccttct atcgccttct tgacgagttc ttctgaaacg cgtgatcgtt 10620
caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt tgccggtctt gcgatgatta 10680
tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat taacatgtaa tgcatgacgt 10740
tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcaatt atacatttaa tacgcgatag 10800
aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg cgcggtgtca tctatgttac 10860
tagatcgacg tccgtacggt taaaaccacc ccagtacatt aaaaacgtcc gcaatgtgtt 10920
attaagttgt ctaagcgtca atttgtttac accacaatat atcctgccac cagccagcca 10980
acagctcccc gaccggcagc tcggcacaaa atcaccactc gatacaggca gcccatcagt 11040
cc 11042

<210> 9

<211> 1254
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de 12 dessaturase de *Lachancea kluyveri* em plantas

<400> 9

atgagcgctg ttaccgttac tggatctgat cctaagaaca gaggatcttc tagcaacacc 60
gagcaagagg ttccaaaagt tgctatcgat accaacggaa acgtgttctc tgttcctgat 120
ttcaccatca aggacatcct tggagctatc cctcatgagt gttacgagag aagattggct 180
acctctctct actacgtgtt cagagatatc ttctgcatgc ttaccaccgg ataccttacc 240
cataagatcc tttaccctct cctcatctct tacacctcta acagcatcat caagttcact 300
ttctgggccc tttacactta cgttcaagga cttttcggaa ccggaatctg ggttctcgct 360
catgagtgtg gacatcaagc tttctctgat tacggaatcg tgaacgattt cgttggatgg 420
accettcact cttaccttat ggttccttac ttcagctgga agtactctca tggaaagcac 480
cataaggcta ctggacacat gaccagagat atggttttcg ttcctgccac caaagaggaa 540
ttcaagaagt ctaggaactt cttcggtaac ctcgctgagt actctgagga ttctccactt 600
agaacccttt acgagcttct tgttcaacaa cttggaggat ggatcgctta cctcttcgtt 660
aacgttacag gacaacctta ccctgatgtt ccttcttgga aatggaacca cttctggctt 720
acctctccac ttttcgagca aagagatgct ctctacatct tcctttctga tcttggaatc 780
ctcacccagg gaatcgttct tactctttgg tacaagaaat tcggaggatg gtccctttc 840
atcaactggt tcgttcctta catctgggtt aaccactggc tcgttttcat cacattcctt 900
cagcacactg atcctactat gcctcattac aacgctgagg aatggacttt cgctaagggt 960
gctgctgcta ctatcgatag aaagttcgga ttcatcggac ctcacatctt ccatgatatc 1020
atcgagactc atgtgcttca ccactactgt tctaggatcc cattctacaa cgctagacct 1080
gcttctgagg ctatcaagaa agttatggga aagcactaca ggtctagcga cgagaacatg 1140
tggaagtcac tttggaagtc tttcaggtct tgccaatacg ttgacggtga taacggtgtt 1200
ctcatgttcc gtaacatcaa caactgcgga gttggagctg ctgagaagta atga 1254

<210> 10

<211> 416

<212> PRT

<213> *Lachancea kluyveri*

<400> 10

Met	Ser	Ala	Val	Thr	Val	Thr	Gly	Ser	Asp	Pro	Lys	Asn	Arg	Gly	Ser
1				5					10					15	

```
Ser Ser Asn Thr Glu Gln Glu Val Pro Lys Val Ala Ile Asp Thr Asn
            20                  25                  30

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

Ala Ile Pro His Glu Cys Tyr Glu Arg Arg Leu Ala Thr Ser Leu Tyr
    50                  55                  60

Tyr Val Phe Arg Asp Ile Phe Cys Met Leu Thr Thr Gly Tyr Leu Thr
65                  70                  75                  80

His Lys Ile Leu Tyr Pro Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Ser Ile
                85                  90                  95

Ile Lys Phe Thr Phe Trp Ala Leu Tyr Thr Tyr Val Gln Gly Leu Phe
            100                 105                 110

Gly Thr Gly Ile Trp Val Leu Ala His Glu Cys Gly His Gln Ala Phe
        115                 120                 125

Ser Asp Tyr Gly Ile Val Asn Asp Phe Val Gly Trp Thr Leu His Ser
    130                 135                 140

Tyr Leu Met Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Gly Lys His
145                 150                 155                 160

His Lys Ala Thr Gly His Met Thr Arg Asp Met Val Phe Val Pro Ala
                165                 170                 175

Thr Lys Glu Glu Phe Lys Lys Ser Arg Asn Phe Phe Gly Asn Leu Ala
            180                 185                 190

Glu Tyr Ser Glu Asp Ser Pro Leu Arg Thr Leu Tyr Glu Leu Leu Val
        195                 200                 205

Gln Gln Leu Gly Gly Trp Ile Ala Tyr Leu Phe Val Asn Val Thr Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Tyr Pro Asp Val Pro Ser Trp Lys Trp Asn His Phe Trp Leu
225                 230                 235                 240

Thr Ser Pro Leu Phe Glu Gln Arg Asp Ala Leu Tyr Ile Phe Leu Ser
                245                 250                 255

Asp Leu Gly Ile Leu Thr Gln Gly Ile Val Leu Thr Leu Trp Tyr Lys
            260                 265                 270
```

```
Lys Phe Gly Gly Trp Ser Leu Phe Ile Asn Trp Phe Val Pro Tyr Ile
        275                 280                 285

Trp Val Asn His Trp Leu Val Phe Ile Thr Phe Leu Gln His Thr Asp
    290                 295                 300

Pro Thr Met Pro His Tyr Asn Ala Glu Glu Trp Thr Phe Ala Lys Gly
305                 310                 315                 320

Ala Ala Ala Thr Ile Asp Arg Lys Phe Gly Phe Ile Gly Pro His Ile
                325                 330                 335

Phe His Asp Ile Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Cys Ser Arg
            340                 345                 350

Ile Pro Phe Tyr Asn Ala Arg Pro Ala Ser Glu Ala Ile Lys Lys Val
        355                 360                 365

Met Gly Lys His Tyr Arg Ser Ser Asp Glu Asn Met Trp Lys Ser Leu
    370                 375                 380

Trp Lys Ser Phe Arg Ser Cys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Asn Gly Val
385                 390                 395                 400

Leu Met Phe Arg Asn Ile Asn Asn Cys Gly Val Gly Ala Ala Glu Lys
                405                 410                 415
```

<210> 11

<211> 1251

<212> ADN

<213> *Pichia pastoris*

<400> 11

atgtctaagg ttaccgtgtc tggatctgag atccttgagg gatctactaa gaccgttagg 60

cgttctggaa acgttgcatc tttcaagcag caaaagaccg ctatcgatac cttcggaaac 120

gttttcaagg tgccagatta caccatcaag gatatccttg acgctatccc taagcactgt 180

tacgagagat ctctcgtgaa gtctatgtct tacgtggtga gagatatcgt ggctatctct 240

gctatcgctt acgttggact tacctacatc cctcttctcc ctaacgaatt ccttagattc 300

gctgcttggt ctgcttacgt gttctctatc tcttgtttcg gattcggaat ctggatcctt 360

ggacatgagt gtggacattc tgctttctct aactacggat gggttaacga taccgttgga 420

tgggttctcc actctcttgt tatggttcct tacttcagct ggaagttctc tcatgctaag 480

caccataagg ctactggaca catgaccaga gatatggttt tcgttcctta caccgccgag 540

gaattcaaag agaagcacca agttaccagc cttcacgata tcgctgagga aactcctatc 600

tactctgttt tcgctctctt gttccaacag cttggaggac tttctcttta ccttgctact 660

aacgctactg gacaaccttа ccctggtgtt tctaagttct tcaagtctca ctactggcct 720

tctagccctg ttttcgataa gaaggactac tggtacatcg ttctttctga tcttggaatc 780

cttgctaccc tcacttctgt ttacaccgct tacaaggttt tcggattctg gcctactttc 840

atcacatggt tctgtccttg gatccttgtt aaccactggc ttgttttcgt taccttcctt 900

cagcacaccg attcttctat gcctcattac gatgctcaag agtggacttt cgctaagggt 960

gctgctgcta ctatcgatag agagttcgga atcctcggaa tcatcttcca tgacatcatc 1020

gagactcatg tgctccatca ctacgtttca aggatcccat tctaccatgc tagagaagct 1080

accgagtgca tcaagaaagt tatgggagag cactacagac acaccgatga gaacatgtgg 1140

gttagccttt ggaaaacttg gagatcttgc cagttcgttg agaaccatga tggtgtgtac 1200

atgttccgta actgcaacaa cgttggagtg aagcctaagg atacctgatg a 1251

<210> 12

<211> 415

<212> PRT

<213> *Pichia pastoris*

<400> 12

```
Met Ser Lys Val Thr Val Ser Gly Ser Glu Ile Leu Glu Gly Ser Thr
1               5                  10                  15

Lys Thr Val Arg Arg Ser Gly Asn Val Ala Ser Phe Lys Gln Gln Lys
            20                  25                  30

Thr Ala Ile Asp Thr Phe Gly Asn Val Phe Lys Val Pro Asp Tyr Thr
        35                  40                  45

Ile Lys Asp Ile Leu Asp Ala Ile Pro Lys His Cys Tyr Glu Arg Ser
    50                  55                  60

Leu Val Lys Ser Met Ser Tyr Val Val Arg Asp Ile Val Ala Ile Ser
65                  70                  75                  80

Ala Ile Ala Tyr Val Gly Leu Thr Tyr Ile Pro Leu Leu Pro Asn Glu
                85                  90                  95

Phe Leu Arg Phe Ala Ala Trp Ser Ala Tyr Val Phe Ser Ile Ser Cys
            100                 105                 110

Phe Gly Phe Gly Ile Trp Ile Leu Gly His Glu Cys Gly His Ser Ala
        115                 120                 125
```

```
Phe Ser Asn Tyr Gly Trp Val Asn Asp Thr Val Gly Trp Val Leu His
    130                 135                 140

Ser Leu Val Met Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Phe Ser His Ala Lys
145                 150                 155                 160

His His Lys Ala Thr Gly His Met Thr Arg Asp Met Val Phe Val Pro
                165                 170                 175

Tyr Thr Ala Glu Glu Phe Lys Glu Lys His Gln Val Thr Ser Leu His
            180                 185                 190

Asp Ile Ala Glu Glu Thr Pro Ile Tyr Ser Val Phe Ala Leu Leu Phe
        195                 200                 205

Gln Gln Leu Gly Gly Leu Ser Leu Tyr Leu Ala Thr Asn Ala Thr Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Tyr Pro Gly Val Ser Lys Phe Phe Lys Ser His Tyr Trp Pro
225                 230                 235                 240

Ser Ser Pro Val Phe Asp Lys Lys Asp Tyr Trp Tyr Ile Val Leu Ser
                245                 250                 255

Asp Leu Gly Ile Leu Ala Thr Leu Thr Ser Val Tyr Thr Ala Tyr Lys
            260                 265                 270

Val Phe Gly Phe Trp Pro Thr Phe Ile Thr Trp Phe Cys Pro Trp Ile
        275                 280                 285

Leu Val Asn His Trp Leu Val Phe Val Thr Phe Leu Gln His Thr Asp
    290                 295                 300

Ser Ser Met Pro His Tyr Asp Ala Gln Glu Trp Thr Phe Ala Lys Gly
305                 310                 315                 320

Ala Ala Ala Thr Ile Asp Arg Glu Phe Gly Ile Leu Gly Ile Ile Phe
                325                 330                 335

His Asp Ile Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Val Ser Arg Ile
            340                 345                 350

Pro Phe Tyr His Ala Arg Glu Ala Thr Glu Cys Ile Lys Lys Val Met
        355                 360                 365

Gly Glu His Tyr Arg His Thr Asp Glu Asn Met Trp Val Ser Leu Trp
    370                 375                 380
```

```
Lys Thr Trp Arg Ser Cys Gln Phe Val Glu Asn His Asp Gly Val Tyr
385                 390                 395                 400

Met Phe Arg Asn Cys Asn Asn Val Gly Val Lys Pro Lys Asp Thr
                405                 410                 415
```

<210> 13

<211> 1392

<212> ADN

<213> *Micromonas pusilla*

<400> 13

```
atgtgcccgc cgaagacgga cggccgatcg tccccgcgat cgccgctgac gcgcagcaaa      60
tcctccgcgg aggcgctcga cgccaaggac gcgtcgaccg cgcccgtcga tctcaaaacg     120
ctcgagccgc acgagctcgc ggcgacgttc gagacgcgat gggtgcgcgt ggaggacgtc     180
gagtacgacg tcacaaactt caaacacccg ggaggcagcg tgatattcta catgctcgcg     240
aacacgggcg cggacgccac ggaggcgttc aaggagttcc acatgcgatc gcttaaggcg     300
tggaagatgc tcagagcgct gccgtcgcgc cccgcggaga tcaaacgcag cgagagcgag     360
gacgcgccga tgttggagga tttcgcgcgg tggcgcgcgg agctcgaacg cgacgggttc     420
tttaagccct cgataacgca cgtcgcgtat cggttactcg agctcctcgc gaccttcgcc     480
ctcggcaccg ccctcatgta cgccgggtac ccgatcatcg cgtccgtcgt gtacggcgcg     540
ttcttcggcg ctcggtgcgg ttgggtccag cacgagggcg ggcacaactc gctcacgggg     600
tccgtctacg tcgacaagcg cctccaagcg atgacgtgcg ggttcgggct gtccacgagc     660
ggggagatgt ggaaccagat gcacaataag caccacgcga cgccgcagaa agtgaggcac     720
gacatggacc tggacacgac ccccgcggtg gcgtttttta acaccgccgt ggaggacaac     780
cggccgaggg ggttctcccg cgcgtgggct cggcttcagg cgtggacgtt cgtcccggtg     840
acctccgggc tgctcgtcca ggcgttctgg atctacgtcc tgcacccgcg gcaggtgttg     900
cgaaagaaga actacgagga ggcgtcgtgg atgctcgtct ctcacgtcgt caggaccgcg     960
gtgattaaac tcgcgacggg gtactcgtgg cccgtcgcgt actggtggtt caccttcggc    1020
aactggatcg cgtacatgta cctcttcgcg cacttctcca cgagccacac gcacctcccg    1080
gtcgtgccct cggataagca cctgagctgg gtgaactacg cggtcgatca caccgtggac    1140
atcgacccgt cgcgcgggta cgtgaactgg ttgatgggat atctgaactg ccaggtcatt    1200
catcacctgt tcccggacat gccgcagttt cgccagccgg aggtgagccg gcggttcgtc    1260
ccgttcgcga agaagtgggg gctgaactac aaggtgctgt cctattacgg cgcctggaag    1320
gcgacgttct cgaacttgga taaggtcggg cagcactact acgtcaacgg caaggcggag    1380
aaggcgcact ga                                                        1392
```

<210> 14
<211> 1395
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de 6 dessaturase de *Micromonas pusilla* em plantas (versão 1É

<400> 14

atgtgccctc ctaagactga tggaagatct tctcctagat ctccacttac caggtctaaa 60

tcttctgctg aggctcttga tgctaaggat gcttctactg ctcctgttga tcttaagact 120

cttgagcctc atgagcttgc tgctactttc gagactagat gggttagagt tgaggacgtt 180

gagtacgatg tgactaactt caagcaccct ggtggatctg tgatcttcta catgcttgct 240

aacactggtg ctgatgctac tgaggctttc aaagaattcc acatgcgttc tctcaaggct 300

tggaagatgc ttagagcttt gccttctaga cctgctgaga tcaagagatc tgagtctgag 360

gatgctccta tgcttgagga tttcgctaga tggcgtgctg agcttgagag agatggattc 420

ttcaagcctt ctatcaccca tgtggcttac agacttctcg agcttcttgc tacattcgct 480

cttggaactg ctcttatgta cgctggatac cctatcattg cttctgttgt ttacggtgct 540

ttcttcggag ctagatgtgg atgggttcaa catgagggtg gacataactc tcttaccgga 600

tctgtttacg tggacaagag acttcaggct atgacttgtg gattcggact ttctacttct 660

ggtgagatgt ggaaccagat gcataacaag caccatgcta cccctcaaaa ggttagacac 720

gatatggatc ttgataccac tcctgctgtg gctttcttca acactgctgt tgaggataac 780

agacctagag gattctctag agcttgggct agacttcaag cttggacttt cgttcctgtt 840

acctctggac ttcttgttca agctttctgg atctacgttc tccaccctag acaagttctc 900

cgtaagaaga actacgaaga ggcttcttgg atgctcgttt ctcatgttgt tagaaccgct 960

gttatcaagc ttgctactgg atactcttgg cctgttgctt actggtggtt cactttcgga 1020

aactggatcg cttacatgta ccttttcgct cacttctcta cttctcatac tcacctccct 1080

gttgttccat ctgataagca cctttcttgg gttaactacg ctgttgatca caccgttgat 1140

atcgatcctt ctagaggata cgtgaactgg cttatgggat accttaactg tcaggttatc 1200

caccacctct tccctgatat gcctcaattc agacagcctg aggttagcag aagattcgtt 1260

cctttcgcta agaagtgggg actcaactac aaggtgctct cttactacgg tgcttggaag 1320

gctactttct ctaaccttga taaggtggga cagcactact acgttaacgg aaaggctgag 1380

aaggctcact aatga 1395

<210> 15
<211> 1395
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de 6 dessaturase de *Micromonas pusilla* em plantas (versão 2É

<400> 15

atgtgtcctc ctaagaccga tggaagatct tctcctagat ctcctctcac caggtctaag 60
tcatctgctg aggctcttga tgctaaggat gcttctaccg ctcctgttga tcttaagacc 120
cttgagcctc atgaacttgc tgctaccttc gagactagat gggttagggt tgaggatgtt 180
gagtacgacg tgaccaactt caaacatcct ggtggaagcg tgatcttcta catgcttgct 240
aacactggtg ctgatgctac tgaggctttc aaagaatttc acatgcgtag cctcaaggct 300
tggaagatgc ttagagcttt gccttctaga cctgctgaga tcaagagatc tgagtctgag 360
gatgctccta tgcttgagga tttcgctagg tggagagctg aacttgagag ggacggattc 420
ttcaagcctt ctatcaccca tgttgcttac cgtcttttgg agcttcttgc tactttcgct 480
cttggaaccg ctcttatgta cgctggatac cctatcattg ctagcgttgt gtacggtgct 540
ttcttcggag ctagatgtgg atgggttcaa catgagggtg gacacaactc tcttaccgga 600
tctgtgtacg tggataagag acttcaggct atgacttgcg gattcggact ttctaccagc 660
ggagagatgt ggaaccagat gcataacaag caccatgcta cccctcagaa agttagacac 720
gacatggatc ttgataccac tcctgctgtg gctttcttca acaccgctgt ggaggataat 780
agacctaggg gattctctag agcttgggct agacttcaag cttggacctt cgttcctgtt 840
acttctggac ttctcgttca ggctttctgg atctacgttc tccatcctag acaggtgctc 900
aggaagaaga actacgagga agcttcttgg atgctcgttt ctcacgttgt tagaaccgct 960
gttatcaagc ttgctaccgg atactcttgg cctgttgctt actggtggtt cactttcgga 1020
aactggatcg cttacatgta cctcttcgct cacttctcta cttctcacac tcacctccct 1080
gttgttccat ctgacaagca ccttagctgg gttaactacg ctgttgatca caccgttgac 1140
atcgatcctt ctcgtggata cgttaactgg cttatgggat accttaactg ccaggttatc 1200
caccatctct tcctgatat gcctcaattc agacagcctg aggtgtcaag aagattcgtc 1260
cctttcgcta agaagtgggg actcaactac aaggtgctct cttactacgg tgcttggaag 1320
gctactttca gcaacctcga caaagttgga cagcactact acgttaacgg aaaggctgag 1380
aaggctcact gatga 1395

<210> 16

<211> 463

<212> PRT

<213> *Micromonas pusilla*

<400> 16

```
Met Cys Pro Pro Lys Thr Asp Gly Arg Ser Ser Pro Arg Ser Pro Leu
1               5                  10                  15

Thr Arg Ser Lys Ser Ser Ala Glu Ala Leu Asp Ala Lys Asp Ala Ser
            20                  25                  30

Thr Ala Pro Val Asp Leu Lys Thr Leu Glu Pro His Glu Leu Ala Ala
        35                  40                  45

Thr Phe Glu Thr Arg Trp Val Arg Val Glu Asp Val Glu Tyr Asp Val
    50                  55                  60

Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Phe Tyr Met Leu Ala
65                  70                  75                  80

Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Met Arg
                85                  90                  95

Ser Leu Lys Ala Trp Lys Met Leu Arg Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala
            100                 105                 110

Glu Ile Lys Arg Ser Glu Ser Glu Asp Ala Pro Met Leu Glu Asp Phe
        115                 120                 125

Ala Arg Trp Arg Ala Glu Leu Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser
    130                 135                 140

Ile Thr His Val Ala Tyr Arg Leu Leu Glu Leu Leu Ala Thr Phe Ala
145                 150                 155                 160

Leu Gly Thr Ala Leu Met Tyr Ala Gly Tyr Pro Ile Ile Ala Ser Val
                165                 170                 175

Val Tyr Gly Ala Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu
            180                 185                 190

Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Ser Val Tyr Val Asp Lys Arg Leu
        195                 200                 205

Gln Ala Met Thr Cys Gly Phe Gly Leu Ser Thr Ser Gly Glu Met Trp
    210                 215                 220

Asn Gln Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His
225                 230                 235                 240

Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala
                245                 250                 255
```

```
Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Arg Ala Trp Ala Arg Leu
            260                 265                 270

Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Leu Leu Val Gln Ala
        275                 280                 285

Phe Trp Ile Tyr Val Leu His Pro Arg Gln Val Leu Arg Lys Lys Asn
    290                 295                 300

Tyr Glu Glu Ala Ser Trp Met Leu Val Ser His Val Val Arg Thr Ala
305                 310                 315                 320

Val Ile Lys Leu Ala Thr Gly Tyr Ser Trp Pro Val Ala Tyr Trp Trp
                325                 330                 335

Phe Thr Phe Gly Asn Trp Ile Ala Tyr Met Tyr Leu Phe Ala His Phe
            340                 345                 350

Ser Thr Ser His Thr His Leu Pro Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu
        355                 360                 365

Ser Trp Val Asn Tyr Ala Val Asp His Thr Val Asp Ile Asp Pro Ser
    370                 375                 380

Arg Gly Tyr Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile
385                 390                 395                 400

His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser
                405                 410                 415

Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Gly Leu Asn Tyr Lys Val
            420                 425                 430

Leu Ser Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Ser Asn Leu Asp Lys
        435                 440                 445

Val Gly Gln His Tyr Tyr Val Asn Gly Lys Ala Glu Lys Ala His
    450                 455                 460
```

<210> 17

<211> 1449

<212> ADN

<213> *Ostreococcus lucimarinus*

<400> 17

atgtgcgtcg aaacgaccga aggcacatcg cgaacgatgg cgaacgaacg cacgagctcg 60

tcgtcgtcgc tgagcgaagg cggaacgccg acggtgacgg tcgggatggg aagcgaagac 120

gcggggaaga agactcgaaa cgcgagcgtc acggcgtgga cgaaagagtt ggagccgcac 180

gcgatcgcga agacgttcga acggcggtac gtgacgatcg aaggcgtgga atacgatgtg 240

acggatttta agcatcccgg aggatcggtt atttattaca tgctgtcgaa cacgggagcg 300

gacgcgacgg aggcttttaa agagtttcat tatcggtcga aaaaggcgcg caaggcgttg 360

gcggcgttgc cgcataagcc agtggacgcg gcgacgcggg aaccgatcga agatgaggcg 420

atgctgaagg atttcgcgca gtggcgcaag gaattggagc gtgagggatt ttttaagccc 480

tcgccggcgc acgtggcgta tcgattcgcc gagctcgcgg cgatgttcgc gctcggcacg 540

gcgttgatgc acgcgcgttg gcacgtcgct tccgtgatcg tgtactcgtg tttcttcggc 600

gcgcgatgcg gttgggtgca gcacgagggt gggcacaatt cgttgactgg aaacatttgg 660

tgggacaagc gaatccaagc cttcgccgcg gggttcggct tggcgtcgag tggcgacatg 720

tggaacaaca tgcacaacaa gcatcacgcg acgccccaaa aggtgcgaca cgatatggat 780

ctcgacacca ctcccacggt ggcgttcttc aactccgcgg ttgaagaaaa tcgcccgcgg 840

ggattcagta agttgtggtt gcgccttcaa gcgtggacct tcgtgcccgt gacgtccggt 900

atggttttgt tcttctggat gttcgtcttg cacccgcgta acgcgctgcg acgcaaaagc 960

ttcgaagaag cggcttggat gttttccgcg cacgtcattc gcacggcggt tatcaaagcc 1020

gtcaccggct actcctggat cgcctcgtac ggcttgttcg cggcgacgat gtgggcgagc 1080

ggatgttact tgttcgcgca cttttccacg tctcacacgc acttggatgt cgtgccgagc 1140

gataaacacc tctcgtgggt gcgatacgcc gtcgatcaca cgatcgacat caatccgaac 1200

aacagcgtcg tcaactggtt gatgggctac ttgaactgcc aagtcatcca tcacctgttc 1260

ccggatatgc ctcagttccg ccaacccgaa gtctcccgcc gattcgtccc gtttgcgaag 1320

aagtggaact taaactacaa ggtcttgacg tattatgggg cctggaaggc gacgttcggc 1380

aacttgaacg acgtcgggaa gcactattac gtgcacggat ctcagcgcgt caaatcaaag 1440

tcggcgtga 1449

<210> 18

<211> 1449

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>
<223> Grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de 6 dessaturase de *Ostreococcus lucimarinus* em plantas

<400> 18

atgtgtgttg agactactga gggaacctct agaactatgg ctaacgagag gacctcttct 60

tcttcttcac tctctgaggg tggaactcct actgttactg tgggaatggg atctgaggat 120

gctggaaaga aaaccagaaa cgcttctgtt actgcttgga ccaaagagct tgagcctcac 180

gctatcgcta agaccttcga gagaagatac gttaccatcg agggtgttga gtacgatgtg 240

accgatttca aacaccctgg tggatctgtg atctactaca tgctctctaa cactggtgct 300

gatgctactg aggctttcaa agagttccac taccgttcta agaaggctag aaaggctctt 360

gctgctcttc ctcacaagcc tgttgatgct gctactagag agcctattga ggacgaggct 420

atgcttaagg atttcgctca gtggagaaaa gagttggaga gagagggatt cttcaagcct 480

tctcctgctc atgttgctta ccgtttcgct gaactcgctg ctatgttcgc tcttggaacc 540

gctcttatgc atgctagatg gcacgttgct agcgttatcg tgtactcctg tttcttcgga 600

gctagatgtg gatgggttca acatgagggt ggacacaact ctcttaccgg aaacatctgg 660

tgggataaga gaatccaagc tttcgctgct ggattcggac ttgcttcttc tggtgacatg 720

tggaacaaca tgcacaacaa gcaccatgct actcctcaga aagtgagaca cgatatggat 780

cttgatacca cccctaccgt tgctttcttc aactctgctg tggaggaaaa cagacctagg 840

ggattctcta agctttggct cagacttcaa gcttggacct tcgttcctgt tacctctgga 900

atggtgctct tcttctggat gttcgttctc catcctagaa acgctctccg tcgtaagtct 960

ttcgaagagg ctgcttggat gttctctgct cacgttatca gaaccgctgt tatcaaggct 1020

gttaccggat actcttggat cgctagctac ggacttttcg ctgctactat gtgggcttct 1080

ggatgctacc ttttcgctca cttctctact tctcacaccc acctcgatgt tgttccatct 1140

gataagcacc ttagctgggt taggtacgct gttgatcaca ccatcgacat caaccctaac 1200

aactctgttg tgaactggct tatgggatac cttaactgcc aggttatcca ccatctcttc 1260

cctgatatgc ctcaattcag acagcctgag gtgtcaagaa gattcgtccc tttcgctaag 1320

aagtggaacc tcaactacaa ggtgctcact tactacggtg cttggaaggc tactttcgga 1380

aacctcaacg atgttggaaa gcactactac gttcacggat ctcagagagt gaagagcaag 1440

agcgcttga 1449

<210> 19

<211> 482

<212> PRT

<213> *Ostreococcus lucimarinus*

<400> 19

```
Met Cys Val Glu Thr Thr Glu Gly Thr Ser Arg Thr Met Ala Asn Glu
1               5                  10                  15

Arg Thr Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Glu Gly Gly Thr Pro Thr Val
            20                  25                  30

Thr Val Gly Met Gly Ser Glu Asp Ala Gly Lys Lys Thr Arg Asn Ala
        35                  40                  45
```

```
Ser Val Thr Ala Trp Thr Lys Glu Leu Glu Pro His Ala Ile Ala Lys
    50                  55                  60

Thr Phe Glu Arg Arg Tyr Val Thr Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val
65                  70                  75                  80

Thr Asp Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Val Ile Tyr Tyr Met Leu Ser
                85                  90                  95

Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His Tyr Arg
            100                 105                 110

Ser Lys Lys Ala Arg Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro His Lys Pro Val
        115                 120                 125

Asp Ala Ala Thr Arg Glu Pro Ile Glu Asp Glu Ala Met Leu Lys Asp
    130                 135                 140

Phe Ala Gln Trp Arg Lys Glu Leu Glu Arg Glu Gly Phe Phe Lys Pro
145                 150                 155                 160

Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Phe
                165                 170                 175

Ala Leu Gly Thr Ala Leu Met His Ala Arg Trp His Val Ala Ser Val
            180                 185                 190

Ile Val Tyr Ser Cys Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His
        195                 200                 205

Glu Gly Gly His Asn Ser Leu Thr Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg
    210                 215                 220

Ile Gln Ala Phe Ala Ala Gly Phe Gly Leu Ala Ser Ser Gly Asp Met
225                 230                 235                 240

Trp Asn Asn Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg
                245                 250                 255

His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Thr Val Ala Phe Phe Asn Ser
            260                 265                 270

Ala Val Glu Glu Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Lys Leu Trp Leu Arg
        275                 280                 285

Leu Gln Ala Trp Thr Phe Val Pro Val Thr Ser Gly Met Val Leu Phe
    290                 295                 300
```

```
Phe Trp Met Phe Val Leu His Pro Arg Asn Ala Leu Arg Arg Lys Ser
305                 310                 315                 320

Phe Glu Glu Ala Ala Trp Met Phe Ser Ala His Val Ile Arg Thr Ala
                325                 330                 335

Val Ile Lys Ala Val Thr Gly Tyr Ser Trp Ile Ala Ser Tyr Gly Leu
            340                 345                 350

Phe Ala Ala Thr Met Trp Ala Ser Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe
        355                 360                 365

Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp Val Val Pro Ser Asp Lys His Leu
    370                 375                 380

Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp His Thr Ile Asp Ile Asn Pro Asn
385                 390                 395                 400

Asn Ser Val Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile
                405                 410                 415

His His Leu Phe Pro Asp Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser
            420                 425                 430

Arg Arg Phe Val Pro Phe Ala Lys Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val
        435                 440                 445

Leu Thr Tyr Tyr Gly Ala Trp Lys Ala Thr Phe Gly Asn Leu Asn Asp
    450                 455                 460

Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His Gly Ser Gln Arg Val Lys Ser Lys
465                 470                 475                 480

Ser Ala
```

<210> 20

<211> 456

<212> PRT

<213> *Ostreococcus lucimarinus*

<400> 20

```
Met Cys Val Glu Thr Glu Asn Asn Asp Gly Ile Pro Thr Val Glu Ile
1               5                  10                  15

Ala Phe Asp Gly Glu Arg Glu Arg Ala Glu Ala Asn Val Lys Leu Ser
            20                  25                  30
```

```
Ala Glu Lys Met Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Thr Phe Ala Arg Arg
        35                  40                  45

Tyr Val Val Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val Thr Asp Phe Lys His
    50                  55                  60

Pro Gly Gly Thr Val Ile Phe Tyr Ala Leu Ser Asn Thr Gly Ala Asp
65                  70                  75                  80

Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His His Arg Ser Arg Lys Ala Arg
                85                  90                  95

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala Lys Thr Ala Lys Val
            100                 105                 110

Asp Asp Ala Glu Met Leu Gln Asp Phe Ala Lys Trp Arg Lys Glu Leu
        115                 120                 125

Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg
    130                 135                 140

Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Leu Met Tyr
145                 150                 155                 160

Ala Arg Tyr Val Val Ser Ser Val Leu Val Tyr Ala Cys Phe Phe Gly
                165                 170                 175

Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu Gly Gly His Ser Ser Leu Thr
            180                 185                 190

Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg Ile Gln Ala Phe Thr Ala Gly Phe
        195                 200                 205

Gly Leu Ala Gly Ser Gly Asp Met Trp Asn Ser Met His Asn Lys His
    210                 215                 220

His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr
225                 230                 235                 240

Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg
                245                 250                 255

Gly Phe Ser Lys Tyr Trp Leu Arg Leu Gln Ala Trp Thr Phe Ile Pro
            260                 265                 270

Val Thr Ser Gly Leu Val Leu Leu Phe Trp Met Phe Phe Leu His Pro
```

```
         275                 280                 285

Ser Lys Ala Leu Lys Gly Gly Lys Tyr Glu Glu Leu Val Trp Met Leu
    290                 295                 300

Ala Ala His Val Ile Arg Thr Trp Thr Ile Lys Ala Val Thr Gly Phe
305                 310                 315                 320

Thr Ala Met Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Leu Ala Thr Ser Trp Val Ser
                325                 330                 335

Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp
            340                 345                 350

Val Val Pro Ala Asp Glu His Leu Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp
        355                 360                 365

His Thr Ile Asp Ile Asp Pro Ser Gln Gly Trp Val Asn Trp Leu Met
    370                 375                 380

Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile His His Leu Phe Pro Ser Met Pro
385                 390                 395                 400

Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser Arg Arg Phe Val Ala Phe Ala Lys
                405                 410                 415

Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val Met Thr Tyr Ala Gly Ala Trp Lys
            420                 425                 430

Ala Thr Leu Gly Asn Leu Asp Asn Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His
        435                 440                 445

Gly Gln His Ser Gly Lys Thr Ala
    450                 455
```

<210> 21

<211> 894

<212> ADN

<213> *Pyramimonas cordata*

<400> 21

```
atggagttcg ctcagcctct tgtggctatg gcacaggagc agtatgccgc aattgacgcg      60
gtggtagccc ctgcaatttt ctcagctacc gacagcatcg gttggggtct taagcccatt     120
agcagcgcga caaaggatct tcctctcgtt gagagtccga cgccgctcat actgagcctg     180
ttggcctatt ttgcgatcgt cggctctggg ctggtgtacc gcaaagtatt ccctcgcaca     240
gtaaaggggc aagacccctt cctgctgaag gcgctcatgc ttgcgcacaa cgtgttcctc     300

attggcctca gtctatacat gtgcttgaag cttgtctacg aggcttacgt caacaagtac     360
tccttctggg gaaacgccta caaccccgca cagaccgaga tggcgaaggt catctggatt     420
ttctacgtct ccaagatcta tgagttcatg gacacgttca tcatgctctt gaagggcaac     480
gtcaaccagg tctctttcct gcatgtgtac catcatggct ccatctctgg tatctggtgg     540
atgatcacct acgctgcccc tggcggtgac gcgtacttct cggcggcgct caactcgtgg     600
gtgcacgtgt gcatgtacac gtactacttc atggcggcgg tgctgcccaa ggacgagaag     660
accaagcgca agtacctctg gtggggccgc tacctgaccc agatgcagat gttccagttc     720
ttcatgaacc tgctccaggc ggtctacctc ctctactcct ctagccccta ccccaagttc     780
atcgcccagc tgctggtggt gtacatggtc acgctgctga tgctcttcgg caacttctac     840
tacatgaagc accacgcgag caagaagcag aagctggcca gcaagaagca gtag           894
```

<210> 22
<211> 870
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de 6 elongase de *Pyramimonas cordata* em plantas (truncada na extremidade 3' e codificando elongase funcionalÉ (versão 1É

<400> 22

```
atggaattcg cccagcctct tgttgctatg gctcaagagc aatacgctgc tatcgatgct      60
gttgttgctc ctgctatctt ctctgctact gattctatcg gatggggact taagcctatc     120
tcttctgcta ctaaggactt gcctcttgtt gagtctccta cacctctcat cctttctttg     180
cttgcttact tcgctatcgt tggatctgga ctcgtttaca gaaaggtttt ccctagaacc     240
gtgaagggac aagatccatt ccttttgaag gctcttatgc ttgctcacaa cgtgttcctt     300
atcggacttt ctctttacat gtgcctcaag cttgtgtacg aggcttacgt taacaagtac     360
tctttctggg gaaacgctta caaccctgct caaactgaga tggctaaggt tatctggatc     420
ttctacgtga gcaagatcta cgagttcatg gataccttca tcatgctcct caagggaaat     480
gttaaccagg ttagcttcct tcacgtttac catcacggat ctatctctgg aatctggtgg     540
atgattactt acgctgctcc tggtggtgat gcttacttct ctgctgctct taactcttgg     600
gttcacgtgt gtatgtacac ctactatttt atggctgccg tgcttcctaa ggacgagaaa     660
actaagagaa agtacctctg gtggggaaga taccttactc aaatgcagat gttccagttc     720
ttcatgaacc ttctccaggc tgtttacctt ctctactctt catctcctta ccctaagttt     780
atcgctcagc tcctcgtggt gtacatggtt actcttctca tgcttttcgg aaacttctac     840
tacatgaagc accacgctag caagtgatga                                      870
```

<210> 23
<211> 870
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de 6 elongase de *Pyramimonas cordata* em plantas (truncada na extermidade 3' e codificando elongase funcionalÉ (versão 2É

<400> 23

```
atggaattcg cccagcctct tgttgctatg gctcaagagc aatacgctgc tatcgatgct      60
gttgttgctc ctgctatctt ctctgctact gattctatcg gatggggact taagcctatc     120
tcttctgcta ctaaggactt gcctcttgtt gagtctccta cacctctcat cctttctttg     180
cttgcttact tcgctatcgt tggatctgga ctcgtttaca gaaaggtttt ccctagaacc     240
gtgaagggac aagatccatt ccttttgaag gctcttatgc ttgctcacaa cgtgttcctt     300
atcggacttt ctctttacat gtgcctcaag cttgtgtacg aggcttacgt taacaagtac     360
tctttctggg gaaacgctta caaccctgct caaactgaga tggctaaggt tatctggatc     420
ttctacgtga gcaagatcta cgagttcatg gataccttca tcatgctcct caagggaaat     480
gttaaccagg ttagcttcct tcacgtttac catcacggat ctatctctgg aatctggtgg     540
atgattactt acgctgctcc tggtggtgat gcttacttct ctgctgctct taactcttgg     600
gttcacgtgt gtatgtacac ctactatttt atggctgccg tgcttcctaa ggacgagaaa     660
actaagagaa agtacctctg gtggggaaga taccttactc aaatgcagat gttccagttc     720
ttcatgaacc ttctccaggc tgtttacctt ctctactctt catctcctta ccctaagttt     780
atcgctcagc tcctcgtggt gtacatggtt actcttctca tgcttttcgg aaacttctac     840
tacatgaagc accacgctag caagtgatga                                      870
```

<210> 24
<211> 870
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de 6 elongase de *Pyramimonas cordata* em plantas (truncada na extermidade 3' e codificando elongase funcionalÉ (versão 3É

<400> 24

```
atggaatttg ctcaacctct cgttgctatg gctcaagagc agtacgctgc tatcgatgct      60
gttgttgctc ctgctatctt ctctgctacc gactctattg gatggggact caagcctatc     120
tcttctgcta ctaaggatct ccctctcgtt gaatctccta ccctcttat cctttctctc      180
ctcgcttact tcgctatcgt tggttctgga ctcgtttacc gtaaagtgtt ccctagaacc     240
gttaagggac aggatccttt ccttctcaag gctcttatgc tcgctcacaa cgttttcctt     300
```

atcggactca gcctttacat gtgcctcaag ctcgtttacg aggcttacgt gaacaagtac 360

tccttctggg gaaacgctta caaccctgct caaaccgaga tggctaaggt gatctggatc 420

ttctacgtgt ccaagatcta cgagttcatg gacaccttca tcatgcttct caagggaaac 480

gttaaccagg tttccttcct ccatgtttac caccacggat ctatctctgg aatctggtgg 540

atgatcactt atgctgctcc aggtggagat gcttacttct ctgctgctct caactcttgg 600

gttcatgtgt gcatgtacac ctactacttc atggctgctg ttcttcctaa ggacgaaaag 660

accaagagaa agtacctttg gtggggaaga taccttaccc agatgcaaat gttccagttc 720

ttcatgaacc ttctccaggc tgtttacctc ctctactctt cttctcctta ccctaagttc 780

attgctcaac tcctcgttgt ttacatggtt accctcctca tgcttttcgg aaacttctac 840

tacatgaagc accacgcttc taagtgataa 870

<210> 25

<211> 297

<212> PRT

<213> *Pyramimonas cordata*

<400> 25

```
Met Glu Phe Ala Gln Pro Leu Val Ala Met Ala Gln Glu Gln Tyr Ala
1               5                  10                  15

Ala Ile Asp Ala Val Val Ala Pro Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser
            20                  25                  30

Ile Gly Trp Gly Leu Lys Pro Ile Ser Ser Ala Thr Lys Asp Leu Pro
        35                  40                  45

Leu Val Glu Ser Pro Thr Pro Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Tyr Phe
    50                  55                  60

Ala Ile Val Gly Ser Gly Leu Val Tyr Arg Lys Val Phe Pro Arg Thr
65                  70                  75                  80

Val Lys Gly Gln Asp Pro Phe Leu Leu Lys Ala Leu Met Leu Ala His
                85                  90                  95

Asn Val Phe Leu Ile Gly Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Lys Leu Val
            100                 105                 110

Tyr Glu Ala Tyr Val Asn Lys Tyr Ser Phe Trp Gly Asn Ala Tyr Asn
        115                 120                 125

Pro Ala Gln Thr Glu Met Ala Lys Val Ile Trp Ile Phe Tyr Val Ser
    130                 135                 140
```

```
Lys Ile Tyr Glu Phe Met Asp Thr Phe Ile Met Leu Leu Lys Gly Asn
145                 150                 155                 160

Val Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Gly Ser Ile Ser
                165                 170                 175

Gly Ile Trp Trp Met Ile Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr
            180                 185                 190

Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr
        195                 200                 205

Tyr Phe Met Ala Ala Val Leu Pro Lys Asp Glu Lys Thr Lys Arg Lys
    210                 215                 220

Tyr Leu Trp Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Met Gln Met Phe Gln Phe
225                 230                 235                 240

Phe Met Asn Leu Leu Gln Ala Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro
                245                 250                 255

Tyr Pro Lys Phe Ile Ala Gln Leu Leu Val Val Tyr Met Val Thr Leu
            260                 265                 270

Leu Met Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Tyr Met Lys His His Ala Ser Lys
        275                 280                 285

Lys Gln Lys Leu Ala Ser Lys Lys Gln
    290                 295
```

<210> 26

<211> 288

<212> PRT

<213> *Pyramimonas cordata*

<400> 26

```
Met Glu Phe Ala Gln Pro Leu Val Ala Met Ala Gln Glu Gln Tyr Ala
1               5                  10                  15

Ala Ile Asp Ala Val Val Ala Pro Ala Ile Phe Ser Ala Thr Asp Ser
            20                  25                  30

Ile Gly Trp Gly Leu Lys Pro Ile Ser Ser Ala Thr Lys Asp Leu Pro
        35                  40                  45

Leu Val Glu Ser Pro Thr Pro Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Tyr Phe
    50                  55                  60
```

```
Ala Ile Val Gly Ser Gly Leu Val Tyr Arg Lys Val Phe Pro Arg Thr
65                  70                  75                  80

Val Lys Gly Gln Asp Pro Phe Leu Leu Lys Ala Leu Met Leu Ala His
                85                  90                  95

Asn Val Phe Leu Ile Gly Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Lys Leu Val
            100                 105                 110

Tyr Glu Ala Tyr Val Asn Lys Tyr Ser Phe Trp Gly Asn Ala Tyr Asn
        115                 120                 125

Pro Ala Gln Thr Glu Met Ala Lys Val Ile Trp Ile Phe Tyr Val Ser
    130                 135                 140

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

Val Asn Gln Val Ser Phe Leu His Val Tyr His His Gly Ser Ile Ser
                165                 170                 175

Gly Ile Trp Trp Met Ile Thr Tyr Ala Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr
            180                 185                 190

Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr
        195                 200                 205

Tyr Phe Met Ala Ala Val Leu Pro Lys Asp Glu Lys Thr Lys Arg Lys
    210                 215                 220

Tyr Leu Trp Trp Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Met Gln Met Phe Gln Phe
225                 230                 235                 240

Phe Met Asn Leu Leu Gln Ala Val Tyr Leu Leu Tyr Ser Ser Ser Pro
                245                 250                 255

Tyr Pro Lys Phe Ile Ala Gln Leu Leu Val Val Tyr Met Val Thr Leu
            260                 265                 270

Leu Met Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Tyr Met Lys His His Ala Ser Lys
        275                 280                 285
```

<210> 27
<211> 1278
<212> ADN
<213> *Pavlova salina*

<400> 27

atgccgccgc gcgatagcta ctcgtacgcc gccccgccgt cggcccagct gcacgaggtc 60
gataccccgc aggagcatga taagaaggag ctcgtcatcg gtgaccgcgc gtacgacgtg 120
accaactttg tgaagcgcca cccgggtggc aagatcatcg cataccaggt tggcacagat 180
gcgacggacg cgtacaagca gttccatgtg cggtctgcca aggcggacaa gatgctcaag 240
tcgctgcctt cgcgcccggt gcacaagggc tactcgcccc gccgcgctga cctcattgcc 300
gacttccagg agttcaccaa gcagctggag gcggagggca tgtttgagcc gtcgctgccg 360
cacgtggcat accgcctggc ggaggtgatc gcgatgcacg tggccggcgc cgcgctcatc 420
tggcacgggt acaccttcgc gggcattgcc atgctcggcg ttgtgcaggg ccgctgcggc 480
tggctcatgc acgagggcgg ccactactcg ctcacgggca acattgcttt tgaccgtgcc 540
atccaagtcg cgtgctacgg ccttggctgc ggcatgtcgg gcgcgtggtg gcgcaaccag 600
cacaacaagc accacgcgac gccgcagaag ttgcagcacg acgtcgacct cgacaccctc 660
ccgctcgtcg ccttccacga gcggatagcc gccaaggtga agagccccgc gatgaaggcg 720
tggcttagta tgcaggcgaa gctcttcgcg ccagtgacca cgctgctggt cgcgctgggc 780
tggcagctgt acctgcaccc gcgccatatg ctgcgcacca agcactacga cgagctcgcg 840
atgctcggca ttcgctacgg ccttgtcggc tacctcgcgg cgaactacgg cgcggggtac 900
gtgctcgcgt gctacctgct gtacgtgcag ctcggcgcca tgtacatctt ctgcaacttt 960
gccgtgtcgc acacacacct gccggttgtc gagcctaacg agcacgcaac gtgggtggag 1020
tacgccgcga accacacgac caactgctcg ccctcgtggt ggtgcgactg gtggatgtcg 1080
tacctcaact accagatcga gcaccacctc tacccgtcca tgccgcagtt ccgccacccg 1140
aagattgcgc cgcgggtgaa gcagctcttc gagaagcacg gcctgcacta cgacgtgcgt 1200
ggctacttcg aggccatggc ggacacgttt gccaaccttg acaacgtcgc gcacgcgccg 1260
gagaagaaga tgcagtga 1278

<210> 28
<211> 1281
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de 5 dessaturase de *Pavlova salina* em plantas (versão 1É

<400> 28

atgcctccaa gggactctta ctcttatgct gctcctcctt ctgctcaact tcacgaagtt 60

gatactcctc aagagcacga caagaaagag cttgttatcg gagatagggc ttacgatgtt 120

accaacttcg ttaagagaca ccctggtgga aagatcattg cttaccaagt tggaactgat 180

gctaccgatg cttacaagca gttccatgtt agatctgcta aggctgacaa gatgcttaag 240

tctcttcctt ctcgtcctgt tcacaaggga tactctccaa gaagggctga tcttatcgct 300

gatttccaag agttcaccaa gcaacttgag gctgagggaa tgttcgagcc ttctcttcct 360

catgttgctt acagacttgc tgaggttatc gctatgcatg ttgctggtgc tgctcttatc 420

tggcatggat acactttcgc tggaatcgct atgcttggag ttgttcaggg aagatgtgga 480

tggcttatgc atgagggtgg acattactct ctcactggaa acattgcttt cgacagagct 540

atccaagttg cttgttacgg acttggatgt ggaatgtctg gtgcttggtg gcgtaaccag 600

cataacaagc accatgctac tcctcaaaag cttcagcacg atgttgatct tgataccctt 660

cctctcgttg ctttccatga gagaatcgct gctaaggtta agtctcctgc tatgaaggct 720

tggctttcta tgcaagctaa gcttttcgct cctgttacca ctcttcttgt tgctcttgga 780

tggcagcttt accttcatcc tagacacatg ctcaggacta agcactacga tgagcttgct 840

atgctcggaa tcagatacgg acttgttgga taccttgctg ctaactacgg tgctggatac 900

gttctcgctt gttaccttct ttacgttcag cttggagcta tgtacatctt ctgcaacttc 960

gctgtttctc atactcacct ccctgttgtt gagcctaacg agcatgctac ttgggttgag 1020

tacgctgcta accacactac taactgttct ccatcttggt ggtgtgattg gtggatgtct 1080

taccttaact accagatcga gcaccacctt tacccttcta tgcctcaatt cagacaccct 1140

aagatcgctc ctagagttaa gcagcttttc gagaagcacg gacttcacta cgatgttaga 1200

ggatacttcg aggctatggc tgatactttc gctaaccttg ataacgttgc ccatgctcct 1260

gagaagaaaa tgcagtaatg a 1281

<210> 29

<211> 1281

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de 5 dessaturase de *Pavlova salina* em plantas (versão 2É

<400> 29

atgcctccta gggactctta ctcttacgct gctcctcctt ctgctcaact tcacgaggtt 60

gacactcctc aagagcacga caagaaagag cttgttatcg gagatagggc ttacgatgtg 120

accaacttcg ttaagagaca ccctggtgga aagatcattg cttaccaagt gggaactgat 180

gctaccgatg cttacaagca gttccatgtg agatctgcta aggctgacaa gatgctcaag 240

tctctccctt ctagacctgt tcacaaggga tactctccta gaagagctga tcttatcgct 300

gacttccaag agttcactaa gcaacttgag gctgagggaa tgttcgaacc ttctctccct 360

catgttgctt accgtcttgc tgaggttatc gctatgcatg ttgctggtgc tgctcttatc 420

tggcacggat acactttcgc tggaatcgct atgcttggag ttgttcaggg aagatgcgga 480

tggcttatgc atgagggtgg acactactct cttaccggaa acattgcttt cgatagggct 540

atccaagttg cttgttacgg acttggatgc ggaatgtctg gtgcttggtg gagaaaccag 600

cataacaagc accatgctac tcctcaaaag ctccagcacg atgttgatct tgataccctc 660

cctctcgttg ctttccatga gagaatcgct gctaaggtta agtctcctgc tatgaaggct 720

tggctctcca tgcaagctaa actcttcgct cctgttacca ctcttcttgt tgctcttgga 780

tggcagcttt accttcaccc tagacacatg ctcagaacta agcactacga cgagcttgct 840

atgcttggta tcagatacgg acttgtggga taccttgctg ctaactacgg tgctggatac 900

gttcttgctt gctaccttct ctacgttcag cttggagcta tgtacatctt ctgcaacttc 960

gctgtttctc acactcatct ccctgttgtt gagcctaacg agcatgctac ttgggttgag 1020

tacgctgcta accacactac taactgctct ccatcttggt ggtgtgattg gtggatgagc 1080

tacctcaact accagatcga gcatcacctt tacccttcta tgcctcagtt caggcatcct 1140

aagatcgctc ctagagtgaa gcaactcttc gagaagcacg gacttcacta cgatgtgcgt 1200

ggatacttcg aggctatggc tgatactttc gctaacctcg ataacgttgc tcatgctcct 1260

gagaagaaaa tgcaatgatg a 1281

<210> 30

<211> 425

<212> PRT

<213> *Pavlova salina*

<400> 30

```
Met Pro Pro Arg Asp Ser Tyr Ser Tyr Ala Ala Pro Pro Ser Ala Gln
1               5                  10                  15

Leu His Glu Val Asp Thr Pro Gln Glu His Asp Lys Lys Glu Leu Val
            20                  25                  30

Ile Gly Asp Arg Ala Tyr Asp Val Thr Asn Phe Val Lys Arg His Pro
        35                  40                  45

Gly Gly Lys Ile Ile Ala Tyr Gln Val Gly Thr Asp Ala Thr Asp Ala
    50                  55                  60

Tyr Lys Gln Phe His Val Arg Ser Ala Lys Ala Asp Lys Met Leu Lys
65                  70                  75                  80

Ser Leu Pro Ser Arg Pro Val His Lys Gly Tyr Ser Pro Arg Arg Ala
                85                  90                  95

Asp Leu Ile Ala Asp Phe Gln Glu Phe Thr Lys Gln Leu Glu Ala Glu
            100                 105                 110
```

```
Gly Met Phe Glu Pro Ser Leu Pro His Val Ala Tyr Arg Leu Ala Glu
        115                 120                 125

Val Ile Ala Met His Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Trp His Gly Tyr
    130                 135                 140

Thr Phe Ala Gly Ile Ala Met Leu Gly Val Val Gln Gly Arg Cys Gly
145                 150                 155                 160

Trp Leu Met His Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Asn Ile Ala
                165                 170                 175

Phe Asp Arg Ala Ile Gln Val Ala Cys Tyr Gly Leu Gly Cys Gly Met
            180                 185                 190

Ser Gly Ala Trp Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro
        195                 200                 205

Gln Lys Leu Gln His Asp Val Asp Leu Asp Thr Leu Pro Leu Val Ala
    210                 215                 220

Phe His Glu Arg Ile Ala Ala Lys Val Lys Ser Pro Ala Met Lys Ala
225                 230                 235                 240

Trp Leu Ser Met Gln Ala Lys Leu Phe Ala Pro Val Thr Thr Leu Leu
                245                 250                 255

Val Ala Leu Gly Trp Gln Leu Tyr Leu His Pro Arg His Met Leu Arg
            260                 265                 270

Thr Lys His Tyr Asp Glu Leu Ala Met Leu Gly Ile Arg Tyr Gly Leu
        275                 280                 285

Val Gly Tyr Leu Ala Ala Asn Tyr Gly Ala Gly Tyr Val Leu Ala Cys
    290                 295                 300

Tyr Leu Leu Tyr Val Gln Leu Gly Ala Met Tyr Ile Phe Cys Asn Phe
305                 310                 315                 320

Ala Val Ser His Thr His Leu Pro Val Val Glu Pro Asn Glu His Ala
                325                 330                 335

Thr Trp Val Glu Tyr Ala Ala Asn His Thr Thr Asn Cys Ser Pro Ser
            340                 345                 350

Trp Trp Cys Asp Trp Trp Met Ser Tyr Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His
        355                 360                 365
```

```
His Leu Tyr Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Pro Lys Ile Ala Pro
    370                 375                 380

Arg Val Lys Gln Leu Phe Glu Lys His Gly Leu His Tyr Asp Val Arg
385                 390                 395                 400

Gly Tyr Phe Glu Ala Met Ala Asp Thr Phe Ala Asn Leu Asp Asn Val
                405                 410                 415

Ala His Ala Pro Glu Lys Lys Met Gln
            420                 425
```

<210> 31

<211> 1329

<212> ADN

<213> *Pyramimonas cordata*

<400> 31

atgggaaagg gaggcaatgc tagcgctcct actgcgaaga aggaggtgtt gatcgagggg 60

aagttttacg atgtcaccga cttcaggcac cccggtggtt cgatcatcaa gtttctctcg 120

ggttctggtg ctgacgccac cgcttcctac cgcgagttcc acgttaggtc agcgaaggca 180

gacaagttct tgaagacgct gccctcccgc gaagccactc cccaggagct gaagcaggcg 240

gttgagttct ccaagctcaa cccgccctcc gcggagagtg cctctgctcc cctgaccgac 300

cttgccaagg tggaagcgct gaacaaggac ttcgaggctt tccgtgagca gctcattcag 360

gagggcttct ttaagcccaa tatcccgcat gtggtcaagc gcatcacgga agtcgtggcg 420

atgatggccg tagcctcctg gatgatggtg cagaccaacg ctcttgttgt gaccctcgga 480

gttctgatcc gcggcattgc acagggccgg tgcggttggc ttatgcacga gggcggccac 540

tatagtctta ctgggaagat ctccattgat aggcgtctgc aggagtcaat ttacggattc 600

ggctgtggaa tgtccggcgc ctggtggcgc aaccagcaca acaagcacca cgcaacccca 660

cagaagctgc agcatgacgt cgacctggag acccttcctc tgatggcttt caacaacgct 720

gttaccgata gacgcaaggt gaagcctggt agtctccagg ctctgtggct caagtaccag 780

gccttcctct tcttccccgt gacctcccct ctggtcggcc tcggttggac cacccgtcctc 840

cacccccaggc acagcttgcg caccaagcac tatttcgagc tgctctgcat ggctgctcgt 900

tacgcgagtt tcgctgctct tttcgctccc aagtacggac ttgcaggagc tgccgggctc 960

tacctcgcca ccttcgctgt cgggtgcaac tatattttca tcaacttctc ggtctctcac 1020

actcacctgc ccgtgagcgg tgcgagcgag tacctgcatt gggtcgtgta ttcggccatc 1080

cacaccacta acatcaaatc cagcatgctg tgcgattggt ggatgtcatt cctcaacttc 1140

cagatcgagc atcacctgtt cccttcaatg ccccagttcc gccacaagat tatctccccg 1200

cgtgtaaagg ccttgtttga gaagcacggt cttgtgtatg atgtgcgccc ctattggggg 1260

gccatggctg acaccttcaa gaacttgaat gacgttggca ctcacgcatc tcactccaag 1320

gcgcactag 1329

<210> 32

<211> 442

<212> PRT

<213> *Pyramimonas cordata*

<400> 32

```
Met Gly Lys Gly Gly Asn Ala Ser Ala Pro Thr Ala Lys Lys Glu Val
1               5                  10                  15

Leu Ile Glu Gly Lys Phe Tyr Asp Val Thr Asp Phe Arg His Pro Gly
            20                  25                  30

Gly Ser Ile Ile Lys Phe Leu Ser Gly Ser Gly Ala Asp Ala Thr Ala
        35                  40                  45

Ser Tyr Arg Glu Phe His Val Arg Ser Ala Lys Ala Asp Lys Phe Leu
    50                  55                  60

Lys Thr Leu Pro Ser Arg Glu Ala Thr Pro Gln Glu Leu Lys Gln Ala
65                  70                  75                  80

Val Glu Phe Ser Lys Leu Asn Pro Pro Ser Ala Glu Ser Ala Ser Ala
                85                  90                  95

Pro Leu Thr Asp Leu Ala Lys Val Glu Ala Leu Asn Lys Asp Phe Glu
            100                 105                 110

Ala Phe Arg Glu Gln Leu Ile Gln Glu Gly Phe Phe Lys Pro Asn Ile
        115                 120                 125

Pro His Val Val Lys Arg Ile Thr Glu Val Val Ala Met Met Ala Val
    130                 135                 140

Ala Ser Trp Met Met Val Gln Thr Asn Ala Leu Val Val Thr Leu Gly
145                 150                 155                 160

Val Leu Ile Arg Gly Ile Ala Gln Gly Arg Cys Gly Trp Leu Met His
                165                 170                 175

Glu Gly Gly His Tyr Ser Leu Thr Gly Lys Ile Ser Ile Asp Arg Arg
            180                 185                 190
```

```
Leu Gln Glu Ser Ile Tyr Gly Phe Gly Cys Gly Met Ser Gly Ala Trp
        195                 200                 205

Trp Arg Asn Gln His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Leu Gln
    210                 215                 220

His Asp Val Asp Leu Glu Thr Leu Pro Leu Met Ala Phe Asn Asn Ala
225                 230                 235                 240

Val Thr Asp Arg Arg Lys Val Lys Pro Gly Ser Leu Gln Ala Leu Trp
                245                 250                 255

Leu Lys Tyr Gln Ala Phe Leu Phe Phe Pro Val Thr Ser Leu Leu Val
            260                 265                 270

Gly Leu Gly Trp Thr Thr Val Leu His Pro Arg His Ser Leu Arg Thr
        275                 280                 285

Lys His Tyr Phe Glu Leu Leu Cys Met Ala Ala Arg Tyr Ala Ser Phe
    290                 295                 300

Ala Ala Leu Phe Ala Pro Lys Tyr Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Leu
305                 310                 315                 320

Tyr Leu Ala Thr Phe Ala Val Gly Cys Asn Tyr Ile Phe Ile Asn Phe
                325                 330                 335

Ser Val Ser His Thr His Leu Pro Val Ser Gly Ala Ser Glu Tyr Leu
            340                 345                 350

His Trp Val Val Tyr Ser Ala Ile His Thr Thr Asn Ile Lys Ser Ser
        355                 360                 365

Met Leu Cys Asp Trp Trp Met Ser Phe Leu Asn Phe Gln Ile Glu His
    370                 375                 380

His Leu Phe Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg His Lys Ile Ile Ser Pro
385                 390                 395                 400

Arg Val Lys Ala Leu Phe Glu Lys His Gly Leu Val Tyr Asp Val Arg
                405                 410                 415

Pro Tyr Trp Gly Ala Met Ala Asp Thr Phe Lys Asn Leu Asn Asp Val
            420                 425                 430

Gly Thr His Ala Ser His Ser Lys Ala His
        435                 440
```

<210> 33
<211> 804
<212> ADN
<213> *Pyramimonas cordata*

<400> 33

```
atggcgtcta ttgcgattcc ggctgcgctg gcagggactc ttggttatgt gacgtacaat    60
gtcgcaaacc cagatattcc tgcatccgag aaggtgcctg cttactttat gcaggtcgag   120
tattgggggc caacgattgg gaccatcggt tatcttctgt tcatctactt tggtaaacgg   180
attatgcaaa acaggagcca gccgtttggc ctgaagaacg ctatgctggt gtacaacttc   240
tatcagactt tcttcaactc gtactgcata taccttttg tcacgtcgca ccgcgctcag   300
gggctgaaag tttggggaaa catccccgat atgactgcca acagctgggg gatctcacag   360
gtgatctggc tgcactacaa caacaagtac gttgagctgc tggacacgtt cttcatggtc   420
atgcgcaaga agtttgacca gctttcgttc ctgcacattt accatcatac cctgttgatc   480
tggtcttggt tcgtggtgat gaaattggag cccgttgggg actgctactt tggctctagc   540
gtcaacacgt ttgtgcacgt cattatgtac tcgtactatg gccttgccgc gctcggggtg   600
aattgcttct ggaagaagta cattacgcag attcagatgc tgcagttctg tatctgcgct   660
tcgcactcga tttataccgc ctatgtgcag aacaccgcgt tctggttgcc ttacttgcag   720
ctgtgggtga tggtgaacat gttcgtgttg ttcgccaact tctatcgcaa gcgctacaag   780
agcaagggtg ccaagaagca gtaa                                          804
```

<210> 34
<211> 807
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de 5 elongase de *Pyramimonas cordata* em plantas (versão 1É

<400> 34

```
atggcctcta tcgctatccc tgctgctctt gctggaactc ttggatacgt tacctacaat      60
gtggctaacc ctgatatccc agcttctgag aaagttcctg cttacttcat gcaggttgag      120
tactggggac ctactatcgg aactattgga tacctcctct tcatctactt cggaaagcgt      180
atcatgcaga acagatctca acctttcgga ctcaagaacg ctatgctcgt ttacaacttc      240
taccagacct tcttcaacag ctactgcatc taccttttcg ttacttctca tagggctcag      300
ggacttaagg tttggggaaa catccctgat atgactgcta actcttgggg aatctctcag      360
gttatctggc ttcactacaa caacaagtac gttgagcttc tcgacacctt cttcatggtg      420
atgaggaaga agttcgacca gctttctttc cttcacatct accaccacac tcttctcatc      480
tggtcatggt tcgttgttat gaagcttgag cctgttggag attgctactt cggatcttct      540

gttaacacct tcgtgcacgt gatcatgtac tcttactacg gacttgctgc tcttggagtt      600
aactgtttct ggaagaagta catcacccag atccagatgc ttcagttctg tatctgtgct      660
tctcactcta tctacaccgc ttacgttcag aataccgctt tctggcttcc ttaccttcaa      720
ctctgggtta tggtgaacat gttcgttctc ttcgccaact tctaccgtaa gaggtacaag      780
tctaagggtg ctaagaagca gtgataa                                          807
```

<210> 35
<211> 867
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de 5 elongase de *Pyramimonas cordata* em plantas (versão 2É

<400> 35

```
atggaatttg ctcaacctct cgttgctatg gctcaagagc agtacgctgc tatcgatgct      60
gttgttgctc ctgctatctt ctctgctacc gactctattg gatggggact caagcctatc     120
tcttctgcta ctaaggatct ccctctcgtt gaatctccta ccctcttat cctttctctc      180
ctcgcttact tcgctatcgt tggttctgga ctcgtttacc gtaaagtgtt ccctagaacc     240
gttaagggac aggatccttt ccttctcaag gctcttatgc tcgctcacaa cgttttcctt     300
atcggactca gcctttacat gtgcctcaag ctcgtttacg aggcttacgt gaacaagtac     360
tccttctggg gaaacgctta caaccctgct caaaccgaga tggctaaggt gatctggatc     420
ttctacgtgt ccaagatcta cgagttcatg gacaccttca tcatgcttct caagggaaac     480
gttaaccagg tttccttcct ccatgtttac caccacggat ctatctctgg aatctggtgg     540
atgatcactt atgctgctcc aggtggagat gcttacttct ctgctgctct caactcttgg     600
gttcatgtgt gcatgtacac ctactacttc atggctgctg ttcttcctaa ggacgaaaag     660
accaagagaa agtacctttg gtggggaaga taccttaccc agatgcaaat gttccagttc     720
ttcatgaacc ttctccaggc tgtttacctc ctctactctt cttctcctta ccctaagttc     780
attgctcaac tcctcgttgt ttacatggtt accctcctca tgcttttcgg aaacttctac     840
tacatgaagc accacgcttc taagtga                                         867
```

<210> 36
<211> 807
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de 5 elongase de *Pyramimonas cordata* em plantas (versão 3É

<400> 36

```
atggcttcta tcgctatccc tgctgctctt gctggaactc ttggatacgt gacctacaac      60
gtggctaacc ctgatattcc tgcttctgag aaggttccag cttacttcat gcaagtggag     120
tactggggac ctactatcgg aactatcggt tacctcctct tcatctactt cggaaagcgt     180
atcatgcaaa acagaagcca gcctttcgga cttaagaacg ctatgctcgt gtacaacttc     240
taccagacct tcttcaacag ctactgcatc tacctcttcg ttacctctca tagggctcag     300
ggacttaaag tttggggaaa catccctgat atgaccgcta actcttgggg aatctctcag     360
gttatctggc tccactacaa caacaagtac gtggagcttc tcgatacctt cttcatggtg     420
atgaggaaga agttcgacca gctttctttc cttcacatct accaccacac tcttctcatc     480
tggtcatggt tcgtggttat gaagctcgag cctgttggag attgctactt cggatctagc     540
gttaacacct tcgtgcacgt gatcatgtac tcttactacg gacttgctgc tcttggagtt     600
aactgcttct ggaagaagta catcacccag atccagatgc ttcagttctg tatctgcgct     660
tctcactcta tctacaccgc ttacgttcag aacactgctt tctggcttcc ttaccttcag     720
ctctgggtga tggttaacat gttcgtgctc ttcgctaact tctaccgtaa aaggtacaag     780
agcaagggtg ctaagaagca gtgataa                                        807
```

<210> 37

<211> 267

<212> PRT

<213> *Pyramimonas cordata*

<400> 37

```
Met Ala Ser Ile Ala Ile Pro Ala Ala Leu Ala Gly Thr Leu Gly Tyr
1               5                  10                  15

Val Thr Tyr Asn Val Ala Asn Pro Asp Ile Pro Ala Ser Glu Lys Val
            20                  25                  30

Pro Ala Tyr Phe Met Gln Val Glu Tyr Trp Gly Pro Thr Ile Gly Thr
        35                  40                  45

Ile Gly Tyr Leu Leu Phe Ile Tyr Phe Gly Lys Arg Ile Met Gln Asn
    50                  55                  60

Arg Ser Gln Pro Phe Gly Leu Lys Asn Ala Met Leu Val Tyr Asn Phe
65                  70                  75                  80

Tyr Gln Thr Phe Phe Asn Ser Tyr Cys Ile Tyr Leu Phe Val Thr Ser
                85                  90                  95

His Arg Ala Gln Gly Leu Lys Val Trp Gly Asn Ile Pro Asp Met Thr
            100                 105                 110
```

```
Ala Asn Ser Trp Gly Ile Ser Gln Val Ile Trp Leu His Tyr Asn Asn
        115                 120                 125

Lys Tyr Val Glu Leu Leu Asp Thr Phe Phe Met Val Met Arg Lys Lys
    130                 135                 140

Phe Asp Gln Leu Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Leu Leu Ile
145                 150                 155                 160

Trp Ser Trp Phe Val Val Met Lys Leu Glu Pro Val Gly Asp Cys Tyr
                165                 170                 175

Phe Gly Ser Ser Val Asn Thr Phe Val His Val Ile Met Tyr Ser Tyr
            180                 185                 190

Tyr Gly Leu Ala Ala Leu Gly Val Asn Cys Phe Trp Lys Lys Tyr Ile
        195                 200                 205

Thr Gln Ile Gln Met Leu Gln Phe Cys Ile Cys Ala Ser His Ser Ile
    210                 215                 220

Tyr Thr Ala Tyr Val Gln Asn Thr Ala Phe Trp Leu Pro Tyr Leu Gln
225                 230                 235                 240

Leu Trp Val Met Val Asn Met Phe Val Leu Phe Ala Asn Phe Tyr Arg
                245                 250                 255

Lys Arg Tyr Lys Ser Lys Gly Ala Lys Lys Gln
            260                 265
```

<210> 38

<211> 1344

<212> ADN

<213> *Pavlova salina*

<400> 38

```
atgcctccga gcgcggcgaa gcagatgggc gcgagcacgg gcgtgcatgc gggcgtcaca      60
gattcgtcgg ccttcacgcg caaggatgtc gccgacaggc cggacctcac gatcgtgggt     120
gacagcgtgt acgatgcgaa ggcgttccgc tccgagcatc cgggtggcgc gcactttgtg     180
tcgctgttcg gcgggcgcga tgccacggag gcgttcatgg agtaccaccg gcgcgcctgg     240
cccaagtcgc gcatgtcgcg cttccacgtc ggctctctgg catcgaccga ggagcccgtc     300
gccgccgatg agggctacct ccagctgtgc gctcgcatcg ccaagatggt gccgtcggtc     360
agcagcgggt tcgcgccggc gtcgtactgg gtgaaggccg ggctgatcct cggctccgcg     420
atcgcgctcg aggcgtacat gctgtacgcg ggcaagcgcc tgctcccgtc gatcgtgctc     480

gggtggctgt ttcgctgat tggcctgaac atccagcacg atgccaacca cggcgcgctc      540
tccaagtcgg cctcggtcaa cctggcgctc gggttgtgcc aggactggat cggcgggagc     600
atgatcctct ggctgcagga gcacgttgtc atgcaccact tgcacaccaa cgacgttgac     660
aaggacccgg accagaaggc gcacggcgcc ctgcggctca agccgaccga cgcgtggagc     720
ccgatgcact ggctgcagca cctctacctg ctgcctgggg agacgatgta cgccttcaag     780
ctgctgtttc tcgacatcag cgagctggtg atgtggcggt gggagggcga gcccatcagc     840
aagctggccg ggtacctctt catgccctcg ctgctcctca agctcacctt ctgggcgcgc     900
tttgtcgcgc tgccgctgta cctcgcgccc agcgtgcaca cggcggtgtg catcgcggcg      960
acggtaatga cggggagctt ctacctcgcc ttcttcttct tcatctcgca caacttcgag     1020
ggcgtggcga gcgtcggacc ggacggcagc atcaccagca tgacgcgcgg cgcatccttc     1080
ctcaagcggc aggccgagac ctcgtccaac gtgggcggcc cgctgctcgc cacgctcaac     1140
ggcggcctca actaccaaat cgagcaccac ctcttcccca gggtgcacca cggcttctac     1200
cctcgcctcg cgccgttggt caaggcggag ctcgaggcgc gcggcattga gtacaagcac     1260
taccccacca tatggagcaa cctggcatcc acgctgaggc acatgtacgc gctcggccgc     1320
aggccgcgca gcaaggcgga gtga                                            1344
```

<210> 39
<211> 1347
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de 4 dessaturase de *Pavlova salina* em plantas (versão 1É

<400> 39

atgccaccta gcgctgctaa gcaaatggga gcttctactg gtgttcatgc tggtgttact 60

gactcttctg ctttcaccag aaaggatgtt gctgatagac ctgatctcac catcgttgga 120

gattctgttt acgatgctaa ggctttcaga tctgagcatc ctggtggtgc tcatttcgtt 180

tctttgttcg gaggaagaga tgctactgag gctttcatgg aataccatag aagggcttgg 240

cctaagtcta gaatgtctag attccacgtt ggatctcttg cttctactga ggaacctgtt 300

gctgctgatg agggatacct tcaactttgt gctaggatcg ctaagatggt gccttctgtt 360

tcttctggat tcgctcctgc ttcttactgg gttaaggctg gacttatcct tggatctgct 420

atcgctcttg aggcttacat gctttacgct ggaaagagac ttctcccttc tatcgttctt 480

ggatggcttt tcgctcttat cggtcttaac atccagcatg atgctaacca tggtgctttg 540

tctaagtctg cttctgttaa ccttgctctt ggactttgtc aggattggat cggaggatct 600

atgatccttt ggcttcaaga gcatgttgtt atgcaccacc tccacactaa cgatgttgat 660

aaggatcctg atcaaaaggc tcacggtgct cttagactca agcctactga tgcttggtca 720

cctatgcatt ggcttcagca tctttacctt ttgcctggtg agactatgta cgctttcaag 780

cttttgttcc tcgacatctc tgagcttgtt atgtggcgtt gggagggtga gcctatctct 840

aagcttgctg gatacctctt tatgccttct ttgcttctca agcttacctt ctgggctaga 900

ttcgttgctt tgcctcttta ccttgctcct tctgttcata ctgctgtgtg tatcgctgct 960

actgttatga ctggatcttt ctacctcgct ttcttcttct tcatctccca caacttcgag 1020

ggtgttgctt ctgttggacc tgatggatct atcacttcta tgactagagg tgctagcttc 1080

cttaagagac aagctgagac ttcttctaac gttggaggac ctcttcttgc tactcttaac 1140

ggtggactca actaccaaat tgagcatcac ttgttcccta gagttcacca tggattctac 1200

cctagacttg ctcctcttgt taaggctgag cttgaggcta gaggaatcga gtacaagcac 1260

taccctacta tctggtctaa ccttgcttct accctcagac atatgtacgc tcttggaaga 1320

aggcctagat ctaaggctga gtaatga 1347

<210> 40
<211> 1347
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de 4 dessaturase de *Pavlova salina* em plantas

(versão 2É

<400> 40

atgcctccat ctgctgctaa acagatggga gcttctactg gtgttcacgc tggtgttacc 60

gattcttctg ctttcaccag aaaggatgtg gctgatagac ctgatcttac catcgttggt 120

gactctgtgt acgatgctaa ggctttcaga tctgagcatc ctggtggtgc tcatttcgtt 180

tcactcttcg gaggaagaga tgctactgag gctttcatgg aataccacag aagagcttgg 240

cctaagtcta ggatgtctag gttccatgtt ggatctcttg cttctaccga ggaacctgtt 300

gctgctgatg agggatacct tcagctttgt gctaggatcg ctaagatggt gccttctgtg 360

tcatctggat tcgctccagc ttcttactgg gttaaggctg gacttatcct cggatctgct 420

atcgctcttg aggcttacat gctctacgct ggaaagagac ttctcccttc tatcgttctt 480

ggatggctct tcgctcttat cggacttaac atccagcatg acgctaacca tggtgctttg 540

tctaagtctg ctagcgttaa ccttgctctt ggactttgtc aggattggat cggaggatct 600

atgatccttt ggctccaaga gcatgttgtt atgcaccacc tccacaccaa cgatgttgat 660

aaggaccctg atcaaaaggc tcatggtgct cttagactca agcctaccga tgcttggtca 720

cctatgcatt ggcttcagca cctttacctt ctccctggtg aaactatgta cgctttcaag 780

ctcctcttcc tcgatatctc tgagcttgtg atgtggagat gggagggtga acctatctct 840

aagctcgctg gatacctctt catgccttct cttctcctca agcttacctt ctgggctaga 900

ttcgttgctc ttcctcttta cctcgctcct tctgttcata ctgctgtgtg tatcgctgct 960

actgttatga ccggaagctt ctaccttgct ttcttcttct tcatcagcca caacttcgag 1020

ggtgttgctt ctgttggacc tgatggatct atcacctcta tgaccagggg agcttctttc 1080

cttaagaggc aggctgagac ttcttctaat gtgggaggac ctcttcttgc tactcttaac 1140

ggtggactca actaccaaat cgagcaccac cttttcccta gagttcacca cggattctac 1200

cctagacttg ctcctcttgt gaaggctgaa cttgaggcta gaggaatcga gtacaagcac 1260

taccctacca tctggtctaa cctcgcttct accctcagac atatgtacgc tcttggaaga 1320

aggcctagat ctaaggctga gtgatga 1347

<210> 41

<211> 447

<212> PRT

<213> *Pavlova salina*

<400> 41

```
Met Pro Pro Ser Ala Ala Lys Gln Met Gly Ala Ser Thr Gly Val His
1               5                  10                  15

Ala Gly Val Thr Asp Ser Ser Ala Phe Thr Arg Lys Asp Val Ala Asp
            20                  25                  30

Arg Pro Asp Leu Thr Ile Val Gly Asp Ser Val Tyr Asp Ala Lys Ala
        35                  40                  45

Phe Arg Ser Glu His Pro Gly Gly Ala His Phe Val Ser Leu Phe Gly
    50                  55                  60

Gly Arg Asp Ala Thr Glu Ala Phe Met Glu Tyr His Arg Arg Ala Trp
65                  70                  75                  80

Pro Lys Ser Arg Met Ser Arg Phe His Val Gly Ser Leu Ala Ser Thr
                85                  90                  95

Glu Glu Pro Val Ala Ala Asp Glu Gly Tyr Leu Gln Leu Cys Ala Arg
            100                 105                 110

Ile Ala Lys Met Val Pro Ser Val Ser Ser Gly Phe Ala Pro Ala Ser
        115                 120                 125

Tyr Trp Val Lys Ala Gly Leu Ile Leu Gly Ser Ala Ile Ala Leu Glu
    130                 135                 140

Ala Tyr Met Leu Tyr Ala Gly Lys Arg Leu Leu Pro Ser Ile Val Leu
```

```
145                 150                 155                 160

Gly Trp Leu Phe Ala Leu Ile Gly Leu Asn Ile Gln His Asp Ala Asn
                165                 170                 175

His Gly Ala Leu Ser Lys Ser Ala Ser Val Asn Leu Ala Leu Gly Leu
            180                 185                 190

Cys Gln Asp Trp Ile Gly Gly Ser Met Ile Leu Trp Leu Gln Glu His
        195                 200                 205

Val Val Met His His Leu His Thr Asn Asp Val Asp Lys Asp Pro Asp
    210                 215                 220

Gln Lys Ala His Gly Ala Leu Arg Leu Lys Pro Thr Asp Ala Trp Ser
225                 230                 235                 240

Pro Met His Trp Leu Gln His Leu Tyr Leu Leu Pro Gly Glu Thr Met
                245                 250                 255

Tyr Ala Phe Lys Leu Leu Phe Leu Asp Ile Ser Glu Leu Val Met Trp
            260                 265                 270

Arg Trp Glu Gly Glu Pro Ile Ser Lys Leu Ala Gly Tyr Leu Phe Met
        275                 280                 285

Pro Ser Leu Leu Leu Lys Leu Thr Phe Trp Ala Arg Phe Val Ala Leu
    290                 295                 300

Pro Leu Tyr Leu Ala Pro Ser Val His Thr Ala Val Cys Ile Ala Ala
305                 310                 315                 320

Thr Val Met Thr Gly Ser Phe Tyr Leu Ala Phe Phe Phe Phe Ile Ser
                325                 330                 335

His Asn Phe Glu Gly Val Ala Ser Val Gly Pro Asp Gly Ser Ile Thr
            340                 345                 350

Ser Met Thr Arg Gly Ala Ser Phe Leu Lys Arg Gln Ala Glu Thr Ser
        355                 360                 365

Ser Asn Val Gly Gly Pro Leu Leu Ala Thr Leu Asn Gly Gly Leu Asn
    370                 375                 380

Tyr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Arg Val His His Gly Phe Tyr
385                 390                 395                 400
```

```
Pro Arg Leu Ala Pro Leu Val Lys Ala Glu Leu Glu Ala Arg Gly Ile
                405                 410                 415

Glu Tyr Lys His Tyr Pro Thr Ile Trp Ser Asn Leu Ala Ser Thr Leu
            420                 425                 430

Arg His Met Tyr Ala Leu Gly Arg Arg Pro Arg Ser Lys Ala Glu
        435                 440                 445
```

<210> 42

<211> 792

<212> ADN

<213> *Isochrysis galbana*

<400> 42

```
atggccctcg caaacgacgc gggagagcgc atctgggcgg ctgtgaccga cccggaaatc      60
ctcattggca ccttctcgta cttgctactc aaaccgctgc tccgcaattc cgggctggtg     120
gatgagaaga agggcgcata caggacgtcc atgatctggt acaacgttct gctggcgctc     180
ttctctgcgc tgagcttcta cgtgacggcg accgccctcg gctgggacta tggtacgggc     240
gcgtggctgc gcaggcaaac cggcgacaca ccgcagccgc tcttccagtg cccgtccccg     300
gtttgggact cgaagctctt cacatggacc gccaaggcat tctattactc caagtacgtg     360
gagtacctcg acacggcctg gctggtgctc aagggcaaga gggtctcctt tctccaggcc     420
ttccaccact ttggcgcgcc gtgggatgtg tacctcggca ttcggctgca caacgagggc     480
gtatggatct tcatgttttt caactcgttc attcacacca tcatgtacac ctactacggc     540
ctcaccgccg ccgggtataa gttcaaggcc aagccgctca tcaccgcgat gcagatctgc     600
cagttcgtgg gcggcttcct gttggtctgg gactacatca acgtcccctg cttcaactcg     660
gacaaaggga agttgttcag ctgggctttc aactatgcat acgtcggctc ggtcttcttg     720
ctcttctgcc acttttttcta ccaggacaac ttggcaacga agaaatcggc caaggcgggc     780
aagcagctct ag                                                        792
```

<210> 43

<211> 263

<212> PRT

<213> *Isochrysis galbana*

<400> 43

```
Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr
1               5                  10                  15

Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
            20                  25                  30

Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg
```

35 40 45

Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Leu Leu Ala Leu Phe Ser Ala Leu
50 55 60

Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Tyr Gly Thr Gly
65 70 75 80

Ala Trp Leu Arg Arg Gln Thr Gly Asp Thr Pro Gln Pro Leu Phe Gln
85 90 95

Cys Pro Ser Pro Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Thr Trp Thr Ala Lys
100 105 110

Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
115 120 125

Val Leu Lys Gly Lys Arg Val Ser Phe Leu Gln Ala Phe His His Phe
130 135 140

Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu His Asn Glu Gly
145 150 155 160

Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Ile Met Tyr
165 170 175

Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Phe Lys Ala Lys Pro
180 185 190

Leu Ile Thr Ala Met Gln Ile Cys Gln Phe Val Gly Gly Phe Leu Leu
195 200 205

Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe Asn Ser Asp Lys Gly Lys
210 215 220

Leu Phe Ser Trp Ala Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Gln Asp Asn Leu Ala Thr Lys Lys Ser
245 250 255

Ala Lys Ala Gly Lys Gln Leu
260

<210> 44
<211> 801
<212> ADN
<213> *Emiliania huxleyi*

<400> 44

```
atgctcgatc gcgcctcgtc cgacgcggcc atctggtctg cggtgtccga tccggaaatc      60
ctgatcggca ctttctccta cctgctgctc aagccgctgc tacgcaactc agggctcgtg     120
gacgagcgga aaggcgccta ccggacctcg atgatctggt acaacgtggt gctcgcgctc     180
ttctccgcga cgagcttcta cgtgactgcg accgcgctcg ggtgggacaa gggcaccggc     240
gagtggctcc gcagtctcac gggcgacagc ccgcagcagc tgtggcaatg cccgtcgagg     300
gtatgggact ccaagctgtt cctgtggacg gccaaggcct tctactactc aaagtacgtg     360
gagtacctcg acacggcgtg gctcgtcctc aaggggaaga aggtctcctt cctgcagggc     420
ttccaccact ttggcgcgcc gtgggacgtg tacctgggca ttcggctgaa gaacgagggc     480
gtgtggatct tcatgttctt caactcgttc atccacacgg tcatgtacac gtactacggc     540
ctcaccgccg cgggctacaa gatccgcggc aagccgatca tcaccgcgat gcaaataagc     600
cagttcgtcg gcggctttgt cctagtgtgg gactacatca acgtgccgtg cttccacgcc     660
gacgccgggc aggtcttcag ctgggtcttt aactatgctt acgtcggctc cgtctttctg     720
ctgttctgcc acttcttcta catggacaac atcgcgaagg ccaaggccaa gaaggccgtc     780
gctacccgca aggcgctgtg a                                               801
```

<210> 45
<211> 801
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Grelha de leitura aberta otimizada por codões para a expressão de 9 elongase de *Emiliania huxleyi* em plantas

<400> 45

```
atgcttgata gagcttcatc tgatgctgct atttggagcg ctgtttctga tcctgagatc      60
cttatcggaa ccttctctta ccttttgctt aagcctctcc tcagaaactc tggacttgtg     120
gatgagagaa agggagctta ccgtacttct atgatctggt acaacgttgt tcttgctctt     180
ttctctgcta cctctttcta cgttactgct actgctcttg gatgggataa gggaactggt     240
gagtggctta gatctcttac tggtgattct cctcaacaac tttggcagtg cccttctaga     300
gtttgggaca gcaaactctt cttgtggact gctaaagcct tctactactc caagtacgtt     360
gagtaccttg atactgcttg gcttgttctc aagggaaaga aggtttcatt cctccaggga     420
ttccatcatt tcggtgctcc atgggatgtt taccttggaa tcaggcttaa gaacgaggga     480
gtttggatct tcatgttctt caacagcttc atccacactg ttatgtacac ttactacgga     540
cttactgctg ctggatacaa gatcagagga aagcctatca tcaccgctat gcaaatctct     600
caattcgttg gtggattcgt tcttgtgtgg gactacatca acgttccttg tttccatgct     660
gatgctggac aagttttctc ttgggtgttc aactacgctt atgtgggatc tgttttcctt     720
cttttctgcc acttcttcta catggacaac attgctaagg ctaaggctaa aaaggctgtt     780
gctaccagaa aggctctttg a                                               801
```

<210> 46
<211> 266
<212> PRT
<213> *Emiliania huxleyi*

<400> 46

```
Met Leu Asp Arg Ala Ser Ser Asp Ala Ala Ile Trp Ser Ala Val Ser
1               5                  10                  15

Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
            20                  25                  30

Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Arg Lys Gly Ala Tyr Arg
        35                  40                  45

Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Val Leu Ala Leu Phe Ser Ala Thr
    50                  55                  60

Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Lys Gly Thr Gly
65                  70                  75                  80

Glu Trp Leu Arg Ser Leu Thr Gly Asp Ser Pro Gln Gln Leu Trp Gln
                85                  90                  95

Cys Pro Ser Arg Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Leu Trp Thr Ala Lys
            100                 105                 110

Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
        115                 120                 125

Val Leu Lys Gly Lys Lys Val Ser Phe Leu Gln Gly Phe His His Phe
    130                 135                 140

Gly Ala Pro Trp Asp Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu Lys Asn Glu Gly
145                 150                 155                 160

Val Trp Ile Phe Met Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Val Met Tyr
                165                 170                 175

Thr Tyr Tyr Gly Leu Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Ile Arg Gly Lys Pro
            180                 185                 190

Ile Ile Thr Ala Met Gln Ile Ser Gln Phe Val Gly Gly Phe Val Leu
```

```
                195                 200                 205

Val Trp Asp Tyr Ile Asn Val Pro Cys Phe His Ala Asp Ala Gly Gln
    210                 215                 220

Val Phe Ser Trp Val Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu
225                 230                 235                 240

Leu Phe Cys His Phe Phe Tyr Met Asp Asn Ile Ala Lys Ala Lys Ala
                245                 250                 255

Lys Lys Ala Val Ala Thr Arg Lys Ala Leu
            260                 265
```

<210> 47

<211> 819

<212> ADN

<213> *Pavlova pinguis*

<400> 47

```
atggttgcgc cacccatcac gctcgagtgg ctgctttcgc cgaagctcaa ggatgcagtg       60
ttcggtgggg aggtgctcta cttctccatt gcctacctgt ttcttgcgcc cattttgaag      120
cgcaccccgt tggtggacac gcggaagggc gcgtataaga gtggtatgat cgcgtacaac      180
gtgatcatgt gcgtgttctc gctggtgtgc ttcatctgcc agctcgcagc cctgggctat      240
gacatgggct acttgcagtg ggtgcgtgac ctcacagggg acgagattgt ccccctctac      300
caggacgtgt ccccgtcccc cgccttctcc aacaagctct tcaagtattc gtctattgcc      360
ttccactact ccaagtatgt tgagtacatg gacaccgcat ggctggtgat gaagggcaag      420
cccgtgtcct tgctccaggg cttccaccac tttggcgccg cctgggacac ctactttggc      480
atcaccttcc agaacgaggg catctacgtg ttcgtggtgc tcaacgcctt catccacacg      540
atcatgtacg catactacgc ggccactgcg gcgggtctca agttctcact gaagttcgtc      600
atcacgctca tgcagatcac ccaattcaac gtgggcttcg taatggtgta tcactacatc      660
accctggagt acttccgcaa ctcaccggag ctcgtcttct cctacctttt caactatgcg      720
tacgtctgca cggttctcct cctcttcatg cagttcttct acatggacaa ctttggcaag      780
aagaaggccg ctgccgccgc gggcaagaag aagaagtag                              819
```

<210> 48

<211> 272

<212> PRT

<213> *Pavlova pinguis*

<400> 48

Met	Val	Ala	Pro	Pro	Ile	Thr	Leu	Glu	Trp	Leu	Leu	Ser	Pro	Lys	Leu
1				5					10					15	

```
Lys Asp Ala Val Phe Gly Gly Glu Val Leu Tyr Phe Ser Ile Ala Tyr
            20                  25                  30

Leu Phe Leu Ala Pro Ile Leu Lys Arg Thr Pro Leu Val Asp Thr Arg
        35                  40                  45

Lys Gly Ala Tyr Lys Ser Gly Met Ile Ala Tyr Asn Val Ile Met Cys
    50                  55                  60

Val Phe Ser Leu Val Cys Phe Ile Cys Gln Leu Ala Ala Leu Gly Tyr
65                  70                  75                  80

Asp Met Gly Tyr Leu Gln Trp Val Arg Asp Leu Thr Gly Asp Glu Ile
                85                  90                  95

Val Pro Leu Tyr Gln Asp Val Ser Pro Ser Pro Ala Phe Ser Asn Lys
            100                 105                 110

Leu Phe Lys Tyr Ser Ser Ile Ala Phe His Tyr Ser Lys Tyr Val Glu
        115                 120                 125

Tyr Met Asp Thr Ala Trp Leu Val Met Lys Gly Lys Pro Val Ser Leu
    130                 135                 140

Leu Gln Gly Phe His His Phe Gly Ala Ala Trp Asp Thr Tyr Phe Gly
145                 150                 155                 160

Ile Thr Phe Gln Asn Glu Gly Ile Tyr Val Phe Val Val Leu Asn Ala
                165                 170                 175

Phe Ile His Thr Ile Met Tyr Ala Tyr Tyr Ala Ala Thr Ala Ala Gly
            180                 185                 190

Leu Lys Phe Ser Leu Lys Phe Val Ile Thr Leu Met Gln Ile Thr Gln
        195                 200                 205

Phe Asn Val Gly Phe Val Met Val Tyr His Tyr Ile Thr Leu Glu Tyr
    210                 215                 220

Phe Arg Asn Ser Pro Glu Leu Val Phe Ser Tyr Leu Phe Asn Tyr Ala
225                 230                 235                 240

Tyr Val Cys Thr Val Leu Leu Leu Phe Met Gln Phe Phe Tyr Met Asp
                245                 250                 255

Asn Phe Gly Lys Lys Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Lys Lys Lys Lys
```

260 265 270

<210> 49
<211> 840
<212> ADN
<213> *Pavlova salina*

<400> 49

atggcgactg aagggatgcc ggcgataacg ctggactggc tgctctcgcc cgggctgaag 60
gatgccgtaa ttggcgggga ggtgctctac ttttcgcttg ggtatctgct gctcgagccc 120
atcctcaagc gctcaccgtt tgtggacaag cgcaagggcg cataccgcaa cggcatgatc 180
gcgtacaaca tcctcatgtg cggtttctcg ctggtatgct tcgtgtgcca gatggcggcg 240
ctcggccttg atcgcggcca cctgcagttt gtccgcgacc tcacgggcga cagcgtggtg 300
cagctctacc aggacgtgag cccatccgct gcattcgcga acaagctctt ccggtactca 360
gcggtggcgt tccactactc aaagtacgtg gagtacatgg acacagcgtg gcttgtgctg 420
aagggcaagc ccgtctcgtt cctgcagggc ttccaccact tcggcgccgc gtgggacacc 480
tactttggca tcacgtttca gaacgagggc acctacgtct ttgtgctgct caacgcattc 540
atccacacaa tcatgtacac ctactacggc gcgacggcag cgggcatcaa aatctcgatg 600
aagccgctga tcaccctcat gcagatcacg cagttcctgc tgggcttcgc gctcgtctac 660
ccgtacattg acctcggcta cttccgtgcg tcgcccgagc tcgtgtggag ctacctgttc 720
aactatgcgt acgtactcat ggtgctcttc ctcttcatgc gcttcttcta ccacgacaac 780
tttagcaagc acaagccaat ctcgcgcatc gactccagca accgcatgaa aaccgagtag 840

<210> 50
<211> 279
<212> PRT
<213> *Pavlova salina*

<400> 50

```
Met Ala Thr Glu Gly Met Pro Ala Ile Thr Leu Asp Trp Leu Leu Ser
1               5                  10                  15

Pro Gly Leu Lys Asp Ala Val Ile Gly Gly Glu Val Leu Tyr Phe Ser
            20                  25                  30

Leu Gly Tyr Leu Leu Leu Glu Pro Ile Leu Lys Arg Ser Pro Phe Val
        35                  40                  45

Asp Lys Arg Lys Gly Ala Tyr Arg Asn Gly Met Ile Ala Tyr Asn Ile
    50                  55                  60

Leu Met Cys Gly Phe Ser Leu Val Cys Phe Val Cys Gln Met Ala Ala
65                  70                  75                  80
```

```
Leu Gly Leu Asp Arg Gly His Leu Gln Phe Val Arg Asp Leu Thr Gly
                85                  90                  95

Asp Ser Val Val Gln Leu Tyr Gln Asp Val Ser Pro Ser Pro Ala Phe
            100                 105                 110

Ala Asn Lys Leu Phe Arg Tyr Ser Ala Val Ala Phe His Tyr Ser Lys
        115                 120                 125

Tyr Val Glu Tyr Met Asp Thr Ala Trp Leu Val Leu Lys Gly Lys Pro
    130                 135                 140

Val Ser Phe Leu Gln Gly Phe His His Phe Gly Ala Ala Trp Asp Thr
145                 150                 155                 160

Tyr Phe Gly Ile Thr Phe Gln Asn Glu Gly Thr Tyr Val Phe Val Leu
                165                 170                 175

Leu Asn Ala Phe Ile His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Gly Ala Thr
            180                 185                 190

Ala Ala Gly Ile Lys Ile Ser Met Lys Pro Leu Ile Thr Leu Met Gln
        195                 200                 205

Ile Thr Gln Phe Leu Leu Gly Phe Ala Leu Val Tyr Pro Tyr Ile Asp
    210                 215                 220

Leu Gly Tyr Phe Arg Ala Ser Pro Glu Leu Val Trp Ser Tyr Leu Phe
225                 230                 235                 240

Asn Tyr Ala Tyr Val Leu Met Val Leu Phe Leu Phe Met Arg Phe Phe
                245                 250                 255

Tyr His Asp Asn Phe Ser Lys His Lys Pro Ile Ser Arg Ile Asp Ser
            260                 265                 270

Ser Asn Arg Met Lys Thr Glu
        275
```

<210> 51

<211> 1284

<212> ADN

<213> *Pavlova salina*

<400> 51

```
atgggacgcg gcggagacag cagtgggcag gcgcatccgg cggcggagct ggcggtcccg      60
agcgaccgcg cggaggtgag caacgctgac agcaaagcgc tgcacatcgt gctgtatggc     120

aagcgcgtgg atgtgaccaa gttccaacgc acgcacccgg gtggtagcaa ggtcttccgg     180
atcttccagg accgcgatgc gacggagcag ttcgagtcct accactcgaa gcgcgcgatc     240
aagatgatgg agggcatgct caagaagtct gaggatgctc ccgccgacac gcccttgccc     300
tcccagtcac cgatggggaa ggacttcaag gcgatgatcg agcggcacgt tgcagcgggt     360
tactacgatc catgcccgct cgatgagctg ttcaagctca gcctcgtgct cctcccgacc     420
tttgcgggca tgtacatgct caaggcgggc gtcggctccc cgctctgcgg cgccctcatg     480
gtgagctttg gctggtacct cgatggctgg ctcgcgcacg actatctgca ccactccgtc     540
ttcaaggggt ccgtcgcacg caccgtcggg tggaacaacg cggcgggcta cttcctcggc     600
ttcgtgcagg ggtatgcggt cgagtggtgg cgcgcgcggc ataacacgca ccacgtgtgc     660
accaatgagg acggctcgga ccccgacatc aaaacggcgc cgctgctcat atacgtgcgc     720
aacaagccga gcatcgccaa gcgcctgaac gccttccagc gctaccagca gtactactat     780
gtgccggtga tggcaatcct cgacctgtac tggcggctcg agtcgatcgc ctacgtcgcg     840
atgcgcctgc cgaagatgct gccgcaggcc ctcgcactcg tcgcgcacta cgccatcgtc     900
gcgtgggtct ttgcgggcaa ctaccacctg ctcccgctcg tgacggttct gcgcgggttt     960
ggcactggga tcaccgtttt cgcgacgcac tacggtgagg acattctcga cgcggaccag    1020
gtgcgtcaca tgacgctcgt cgagcagacg gcactcacct cgcgcaacat ctcgggcggc    1080
tggctcgtga acgtgctcac cggcttcatc tcactgcaga cggagcacca cctgttcccg    1140
atgatgccaa ccggcaacct catgactatc cagcccgagg tgcgcgcctt cttcaagaag    1200
cacggacttg agtaccgcga gggcaacctc attgagtgcg tgcggcagaa catccgtgcg    1260
cttgcattcg agcacctgct ttga                                           1284
```

<210> 52

<211> 427

<212> PRT

<213> *Pavlova salina*

<400> 52

```
Met Gly Arg Gly Gly Asp Ser Ser Gly Gln Ala His Pro Ala Ala Glu
1               5                  10                  15

Leu Ala Val Pro Ser Asp Arg Ala Glu Val Ser Asn Ala Asp Ser Lys
            20                  25                  30

Ala Leu His Ile Val Leu Tyr Gly Lys Arg Val Asp Val Thr Lys Phe
        35                  40                  45

Gln Arg Thr His Pro Gly Gly Ser Lys Val Phe Arg Ile Phe Gln Asp
    50                  55                  60
```

```
Arg Asp Ala Thr Glu Gln Phe Glu Ser Tyr His Ser Lys Arg Ala Ile
65                  70                  75                  80

Lys Met Met Glu Gly Met Leu Lys Lys Ser Glu Asp Ala Pro Ala Asp
                85                  90                  95

Thr Pro Leu Pro Ser Gln Ser Pro Met Gly Lys Asp Phe Lys Ala Met
            100                 105                 110

Ile Glu Arg His Val Ala Ala Gly Tyr Tyr Asp Pro Cys Pro Leu Asp
        115                 120                 125

Glu Leu Phe Lys Leu Ser Leu Val Leu Leu Pro Thr Phe Ala Gly Met
    130                 135                 140

Tyr Met Leu Lys Ala Gly Val Gly Ser Pro Leu Cys Gly Ala Leu Met
145                 150                 155                 160

Val Ser Phe Gly Trp Tyr Leu Asp Gly Trp Leu Ala His Asp Tyr Leu
                165                 170                 175

His His Ser Val Phe Lys Gly Ser Val Ala Arg Thr Val Gly Trp Asn
            180                 185                 190

Asn Ala Ala Gly Tyr Phe Leu Gly Phe Val Gln Gly Tyr Ala Val Glu
        195                 200                 205

Trp Trp Arg Ala Arg His Asn Thr His His Val Cys Thr Asn Glu Asp
    210                 215                 220

Gly Ser Asp Pro Asp Ile Lys Thr Ala Pro Leu Leu Ile Tyr Val Arg
225                 230                 235                 240

Asn Lys Pro Ser Ile Ala Lys Arg Leu Asn Ala Phe Gln Arg Tyr Gln
                245                 250                 255

Gln Tyr Tyr Tyr Val Pro Val Met Ala Ile Leu Asp Leu Tyr Trp Arg
            260                 265                 270

Leu Glu Ser Ile Ala Tyr Val Ala Met Arg Leu Pro Lys Met Leu Pro
        275                 280                 285

Gln Ala Leu Ala Leu Val Ala His Tyr Ala Ile Val Ala Trp Val Phe
    290                 295                 300

Ala Gly Asn Tyr His Leu Leu Pro Leu Val Thr Val Leu Arg Gly Phe
```

```
305                 310                 315                 320

Gly Thr Gly Ile Thr Val Phe Ala Thr His Tyr Gly Glu Asp Ile Leu
                325                 330                 335

Asp Ala Asp Gln Val Arg His Met Thr Leu Val Glu Gln Thr Ala Leu
            340                 345                 350

Thr Ser Arg Asn Ile Ser Gly Gly Trp Leu Val Asn Val Leu Thr Gly
        355                 360                 365

Phe Ile Ser Leu Gln Thr Glu His His Leu Phe Pro Met Met Pro Thr
    370                 375                 380

Gly Asn Leu Met Thr Ile Gln Pro Glu Val Arg Ala Phe Phe Lys Lys
385                 390                 395                 400

His Gly Leu Glu Tyr Arg Glu Gly Asn Leu Ile Glu Cys Val Arg Gln
                405                 410                 415

Asn Ile Arg Ala Leu Ala Phe Glu His Leu Leu
            420                 425
```

<210> 53

<211> 172

<212> PRT

<213> Vírus do emanjericado do tomateiro (*Tomato Bushy Stunt Virus*É

<400> 53

Met Glu Arg Ala Ile Gln Gly Asn Asp Ala Arg Glu Gln Ala Asn Ser
1 5 10 15

Glu Arg Trp Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Thr Ser Pro Phe Lys Leu
20 25 30

Pro Asp Glu Ser Pro Ser Trp Thr Glu Trp Arg Leu His Asn Asp Glu
35 40 45

Thr Asn Ser Asn Gln Asp Asn Pro Leu Gly Phe Lys Glu Ser Trp Gly
50 55 60

Phe Gly Lys Val Val Phe Lys Arg Tyr Leu Arg Tyr Asp Arg Thr Glu
65 70 75 80

Ala Ser Leu His Arg Val Leu Gly Ser Trp Thr Gly Asp Ser Val Asn
85 90 95

Tyr Ala Ala Ser Arg Phe Phe Gly Phe Asp Gln Ile Gly Cys Thr Tyr
100 105 110

Ser Ile Arg Phe Arg Gly Val Ser Ile Thr Val Ser Gly Gly Ser Arg
115 120 125

Thr Leu Gln His Leu Cys Glu Met Ala Ile Arg Ser Lys Gln Glu Leu
130 135 140

Leu Gln Leu Ala Pro Ile Glu Val Glu Ser Asn Val Ser Arg Gly Cys
145 150 155 160

Pro Glu Gly Thr Glu Thr Phe Glu Lys Glu Ser Glu
165 170

<210> 54

<211> 116

<212> PRT

<213> Vírus do frisado amarelo do tomateiro (*Tomato yellow leaf curl virus*É

<400> 54

```
Met Trp Asp Pro Leu Leu Asn Glu Phe Pro Glu Ser Val His Gly Phe
1               5                  10                  15

Arg Cys Met Leu Ala Ile Lys Tyr Leu Gln Ser Val Glu Glu Thr Tyr
            20                  25                  30

Glu Pro Asn Thr Leu Gly His Asp Leu Ile Arg Asp Leu Ile Ser Val
        35                  40                  45

Val Arg Ala Arg Asp Tyr Val Glu Ala Thr Arg Arg Tyr Asn His Phe
    50                  55                  60

His Ala Arg Leu Glu Gly Ser Pro Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Ile
65                  70                  75                  80

Gln Gln Pro Cys Cys Cys Pro His Cys Pro Arg His Lys Gln Ala Thr
                85                  90                  95

Ile Met Asp Val Gln Ala His Val Pro Glu Ala Gln Asn Ile Gln Asn
            100                 105                 110

Val Ser Lys Pro
        115
```

<210> 55

<211> 351

<212> PRT

<213> Vírus do encrespamento do nabo (*Turnip crinkle virus*É

<400> 55

```
Met Glu Asn Asp Pro Arg Val Arg Lys Phe Ala Ser Glu Gly Ala Gln
1               5                  10                  15

Trp Ala Ile Lys Trp Gln Lys Lys Gly Trp Ser Ser Leu Thr Ser Arg
            20                  25                  30

Gln Lys Gln Thr Ala Arg Ala Ala Met Gly Ile Lys Leu Ser Pro Val
        35                  40                  45

Ala Gln Pro Val Gln Lys Val Thr Arg Leu Ser Ala Pro Val Ala Leu
    50                  55                  60

Ala Tyr Arg Glu Val Ser Thr Gln Pro Arg Val Ser Thr Ala Arg Asp
65                  70                  75                  80

Gly Ile Thr Arg Ser Gly Ser Glu Leu Ile Thr Thr Leu Lys Lys Asn
                85                  90                  95

Thr Asp Thr Glu Pro Lys Tyr Thr Thr Ala Val Leu Asn Pro Ser Glu
            100                 105                 110

Pro Gly Thr Phe Asn Gln Leu Ile Lys Glu Ala Ala Gln Tyr Glu Lys
        115                 120                 125

Tyr Arg Phe Thr Ser Leu Arg Phe Arg Tyr Ser Pro Met Ser Pro Ser
    130                 135                 140

Thr Thr Gly Gly Lys Val Ala Leu Ala Phe Asp Arg Asp Ala Ala Lys
145                 150                 155                 160

Pro Pro Pro Asn Asp Leu Ala Ser Leu Tyr Asn Ile Glu Gly Cys Val
                165                 170                 175

Ser Ser Val Pro Trp Thr Gly Phe Ile Leu Thr Val Pro Thr Asp Ser
            180                 185                 190

Thr Asp Arg Phe Val Ala Asp Gly Ile Ser Asp Pro Lys Leu Val Asn
        195                 200                 205

Phe Gly Lys Leu Ile Met Ala Thr Tyr Gly Gln Gly Ala Asn Asp Ala
    210                 215                 220

Ala Gln Leu Gly Glu Val Arg Val Glu Tyr Thr Val Gln Leu Lys Asn
225                 230                 235                 240

Arg Thr Gly Ser Thr Ser Asp Ala Gln Ile Gly Asp Phe Ala Gly Val
```

```
                 245                 250                 255

Lys Asp Gly Pro Arg Leu Val Ser Trp Ser Lys Thr Lys Gly Thr Ala
            260                 265                 270

Gly Trp Glu His Asp Cys His Phe Leu Gly Thr Gly Asn Phe Ser Leu
        275                 280                 285

Thr Leu Phe Tyr Glu Lys Ala Pro Val Ser Gly Leu Glu Asn Ala Asp
    290                 295                 300

Ala Ser Asp Phe Ser Val Leu Gly Glu Ala Ala Ala Gly Ser Val Gln
305                 310                 315                 320

Trp Ala Gly Val Lys Val Ala Glu Arg Gly Gln Ser Val Lys Met Val
                325                 330                 335

Thr Thr Glu Glu Gln Pro Arg Gly Lys Trp Gln Ala Leu Arg Ile
            340                 345                 350
```

<210> 56

<211> 303

<212> PRT

<213> Vírus do mosaico da ervilha (*Pea mosaic virus*É

<400> 56

```
Met His Gly Ile Glu Gln Pro Gln Leu Pro Leu Asp Tyr Val His Arg
1               5                  10                  15

Cys Ala Ser Thr Ser Phe Leu Leu Ala Ser Leu Asp Gly Leu Leu Ser
            20                  25                  30

Glu Ala Arg Glu Leu Ser Gly Pro Leu Ala Leu Ile Thr Ser Ser Tyr
        35                  40                  45

Tyr Leu Leu Val Ser Ile Ala Leu Cys Trp Ala Ile Pro Gly Ser Phe
    50                  55                  60

Trp Tyr Arg Pro Gly Cys Trp Leu Gln Pro Val Ser Gly Arg Asn Leu
65                  70                  75                  80

Ile Phe Cys Gly Pro Thr Glu Ala Leu Gln Arg Phe Arg Leu Tyr Ala
                85                  90                  95

Ala Arg Leu Gly Leu Val Leu Ser Glu Asn Cys Pro Arg His Gly Gln
            100                 105                 110

Ser Ala Ala Ile Thr Leu Gln Ser Tyr Trp Ala Leu Pro Asn Asn Ile
```

```
        115                 120                 125

Trp Met Asp Met Ala Gln Leu Asp Leu Leu Thr Phe Ser Met Pro Ile
    130                 135                 140

Ala Asn Thr Phe Ala Tyr Leu Ala Asp Cys Glu Ala Arg Phe Pro Pro
145                 150                 155                 160

Ile Val Glu Gly Val Gly Ser Ala Tyr Tyr Val Pro Thr Leu Leu Gly
                165                 170                 175

Leu Thr His Gln Asp Pro Arg Leu Tyr Leu Ala Leu Arg Arg Arg Asn
            180                 185                 190

Leu Asp Leu Ser Gly Glu Pro His Arg Val Arg Pro Gly Val Leu Glu
        195                 200                 205

Ser Met Ala Leu Leu Cys Ser Ser Val Arg Ser Thr Ser Arg Ser Arg
    210                 215                 220

Gln Ile Pro Pro Leu Tyr Gly Ser Val Leu His His Val Leu Gly Leu
225                 230                 235                 240

Ala Glu Arg Asp Cys Ile Leu Phe Asp Thr Asp Ser Asn Tyr Ser Ser
                245                 250                 255

Tyr Thr His Arg Val Leu Glu Gln Asp Arg Asn Arg Ala Asp Gln Ser
            260                 265                 270

Leu Phe Ser Ile Asp Leu Glu Tyr Val His Asp Leu Glu Leu Ile Ala
        275                 280                 285

Leu Gly Tyr Ser Asp Glu Asp Asp Glu Asp Leu Asp Asn Phe Phe
    290                 295                 300
```

<210> 57

<211> 256

<212> PRT

<213> Vírus do nanismo amarelo dos cereais (*Cereal yellow dwarf virus*É

<400> 57

```
Met Phe Ile Ala Gln Pro Cys Gly Arg Val Leu Val Phe Asp Val Ala
1               5                  10                  15

Ser Arg Thr Pro Ser Phe Phe Thr Arg Tyr Ser Val Glu Leu Ser Leu
            20                  25                  30

Arg Val Leu Asp Pro Phe Phe Thr Arg Ala Val Thr Asp Phe Arg Tyr
```

35 40 45

Thr Gln Asn Glu Ile Asp Leu Phe Cys Val Ser Leu Gly Phe Leu Leu
50 55 60

Pro Ile Leu Leu Thr Gly Glu Ser Tyr Ser Trp Arg Gly His Leu Asn
65 70 75 80

Leu Pro Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Leu Val Arg Trp Gly Leu Ala Val
85 90 95

Gly Tyr Phe Pro Thr Phe Ser Thr Asp Gly Asp Ile Arg Gln Asn Pro
100 105 110

Glu Leu Arg Ile Asp Leu Ser Thr Met Ser Thr Arg Ser Phe Tyr Glu
115 120 125

Gln Phe Leu Leu Arg Tyr Asn Thr Ser Gly Leu Ala Lys Ala Ile Val
130 135 140

Gly Gln Gln Glu Cys Phe Gln Ser Gly Met Glu Ser Phe Lys Arg Phe
145 150 155 160

Leu His Tyr Arg Leu Thr Cys Phe Glu Ser Cys Leu Pro Arg Pro Arg
165 170 175

Trp Glu Ser Pro Leu Ala Pro Gly Pro Tyr Leu Asp Arg Ala Phe Glu
180 185 190

Ala Thr Leu Leu Gly Arg Met Val Gly His Asn Gln Leu Leu Phe Thr
195 200 205

Gly Leu Ser Ser Asp Ile Thr Arg Tyr Tyr Asn Glu Leu Val Val Glu
210 215 220

Gly Val Pro Val Ala Phe Trp Asp Ala Ala Gly Ile Thr Leu His His
225 230 235 240

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

<210> 58

<211> 519

<212> ADN

<213> Vírus do emanjericado do tomateiro (*Tomato Bushy Stunt Virus*É

<400> 58

```
atggaacgag ctatacaagg aaacgacgct agggaacaag ctaacagtga acgttgggat       60

ggaggatcag gaggtaccac ttctcccttc aaacttcctg acgaaagtcc gagttggact      120
gagtggcggc tacataacga tgagacgaat tcgaatcaag ataatccgct tggtttcaag      180
gaaagctggg gtttcgggaa agttgtattt aagagatatc tcagatacga caggacggaa      240
gcttcactgc acagagtcct tggatcttgg acgggagatt cggttaacta tgcagcatct      300
cgatttttcg gtttcgacca gatcggatgt acctatagta ttcggtttcg aggagttagt      360
atcaccgttt ctggagggtc gcgaactctt cagcatctct gtgagatggc aattcggtct      420
aagcaagaac tgctacagct tgccccaatc gaagtggaaa gtaatgtatc aagaggatgc      480
cctgaaggta ctgagacctt cgaaaaagaa agcgagtaa                              519
```

<210> 59
<211> 351
<212> ADN
<213> Vírus do frisado amarelo do tomateiro (*Tomato yellow leaf curl virus*É

<400> 59

```
atgtgggatc cacttctaaa tgaatttcct gaatctgttc acggatttcg ttgtatgtta       60
gctattaaat atttgcagtc cgttgaggaa acttacgagc ccaatacatt gggccacgat      120
ttaattaggg atcttatatc tgttgtaagg gcccgtgact atgtcgaagc gaccaggcga      180
tataatcatt tccacgcccg cctcgaaggt tcgccgaagg ctgaacttcg acagcccata      240
cagcagccgt gctgctgtcc ccattgtcca aggcacaaac aagcgacgat catggacgta      300
caggcccatg taccggaagc ccagaatata cagaatgtat cgaagccctg a               351
```

<210> 60
<211> 1056

<212> ADN

<213> Vírus do encrespamento do nabo (*Turnip crinkle virus*É

<400> 60

atggaaaatg atcctagagt ccgaaagttc gcatccgagg gcgcccaatg ggcgataaag 60

tggcagaaga agggctggtc atccctaacc agcagacaga aacagaccgc ccgcgcagcg 120

atggggatca agctctcccc tgtggcgcaa cctgtgcaga aagtgactcg actgagtgct 180

ccggtggctc tcgcctaccg cgaggtttcc acccagcctc gggtttctac tgccagggac 240

ggcataacca gaagcggttc tgaactgatc acaaccctga agaagaacac tgacactgaa 300

cctaagtaca ccacagctgt gcttaaccca agcgaacccg gaacattcaa ccaactcatc 360

aaggaggcgg cccagtatga aaaataccga ttcacgtcac tcagatttag gtactctccc 420

atgagccctt caaccaccgg gggcaaggtg gctctggcat tcgaccgaga cgctgccaaa 480

cctccgccca acgacctcgc ttccctctac aacatagagg gttgtgtatc tagcgtgccc 540

tggacagggt ttattttgac cgtcccaaca gattctactg accgctttgt ggcggatggt 600

atcagcgatc caaagcttgt caatttcggc aagctcatca tggccaccta tggccaagga 660

gccaatgatg ccgcccaact cggtgaagtg cgagtcgagt acaccgtgca gctcaagaac 720

agaactggct caaccagcga cgcccagatt ggggacttcg cgggtgttaa ggacggaccc 780

aggttggtct cgtggtccaa gaccaaggga acagctgggt gggagcacga ttgtcatttt 840

ctcggaaccg gaaacttctc gttgacactg ttctacgaga aggcgcccgt ttcggggcta 900

gaaaacgcag acgcctctga cttctcggtc ctgggagaag ccgcagcagg tagtgtccaa 960

tgggctggag tgaaggtagc agaaagggga caaagcgtga aaatggtcac aactgaggag 1020

cagccaaggg gaaaatggca agcactcagg atttag 1056

<210> 61

<211> 912

<212> ADN

<213> Vírus do mosaico da ervilha (*Pea mosaic virus*É

<400> 61

```
atgcacggaa ttgagcagcc tcaactaccg ctagattacg ttcaccgttg cgcatcaacc       60
tccttcttgc tcgcatcact agatggcctc ctttctgaag cccgtgaact ctcagggcct      120
ctggctctca ttacttctag ctattactta cttgtttcta ttgccctctg ctgggcaatc      180
cctggatcct tctggtatag gcctggctgc tggttgcagc cagtctcagg gcggaatctc      240
atcttttgcg gccctaccga ggccttgcaa cgattccgtc tgtacgctgc cagacttggg      300
ttggtcctgt cagagaactg cccaagacac ggccaatcag cagcaatcac ccttcaatca      360
tactgggcac ttcctaacaa catctggatg gacatggccc aattggactt gctcaccttc      420
tcaatgccaa ttgctaatac atttgcctac ttggcagatt gtgaagcaag atttcctcct      480
attgttgaag gagtgggatc tgcttactat gtgccaacgc tgctcggact tactcaccaa      540
gaccccaggc tttatcttgc gcttcgcagg agaaaccttg atcttagtgg cgaacctcat      600
agagttcgtc ctggtgtcct ggagtctatg gctttgctct gttctagtgt acgtagcaca      660
agccgttcca ggcaaattcc tcctttatat ggcagcgttt tgcaccacgt tttgggcctg      720
gccgagagag actgcatcct ctttgatacg gatagtaact actcctctta cactcatcgg      780
gttcttgaac aagaccggaa tcgggctgat cagtcattgt ttagcattga cttggaatat      840
gttcatgacc tggagcttat tgccctgggt tactctgatg aagatgatga agatcttgat      900
aacttcttct ag                                                          912
```

<210> 62

<211> 771

<212> ADN

<213> Vírus do nanismo amarelo dos cereais (*Cereal yellow dwarf virus*É

<400> 62

```
atgttcatcg cccaaccttg cgggcgagtt cttgtgttcg acgtcgcctc ccgcacgcca       60
```

tcgttcttca ctcgttatag tgttgaactc tcgctccgtg ttctagaccc attcttcacg 120

cgagcagtaa cagatttccg atacacccaa aatgaaatcg atttattttg tgtgtctctt 180

ggctttctgt tgccaattct cctcacagga gaatcttact cttggcgcgg tcacctcaac 240

ctccccctttt cttacaccga attacttgtt cgatgggggc tcgcagtggg gtacttccct 300

accttctcca ctgatggtga cattcgacag aacccagaac tccgcatcga cctgtccacc 360

atgtcaaccc gctctttcta cgagcagttc ctactcagat ataacacgag tgggttggca 420

aaagctatcg tcggacagca agagtgcttt caaagcggca tggagtcttt taaaagattc 480

ctacactacc gcctcacgtg ctttgaaagc tgccttccac gacctcgttg ggaaagtcct 540

ttggctcctg gtccttatct ggacagggct tttgaggcaa ctcttctcgg ccgtatggtc 600

ggtcataacc aactactctt taccggtttg tcttctgata tcactaggta ttataacgag 660

ttggttgtgg aaggcgtgcc ggtggctttt tgggacgctg ccggcattac tttgcatcac 720

gctggtgaag aatatttttc gaattcttac attcaaaaga ttcttcaatg a 771

<210> 63

<211> 389

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 63

```
Met Val Ile Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Leu Leu Phe Phe
1               5                  10                  15

Ile Ser Gly Leu Ala Val Asn Leu Phe Gln Ala Val Cys Tyr Val Leu
            20                  25                  30

Ile Arg Pro Leu Ser Lys Asn Thr Tyr Arg Lys Ile Asn Arg Val Val
        35                  40                  45

Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp Ala
    50                  55                  60

Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asn Glu Thr Phe Asn Arg Met
65                  70                  75                  80

Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile Asp
                85                  90                  95

Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly Ser
            100                 105                 110

Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile Gly
        115                 120                 125
```

```
Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp Ala
    130                 135                 140

Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Ser Asp Phe
145                 150                 155                 160

Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe Thr
                165                 170                 175

Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Leu
            180                 185                 190

Pro Ile Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val Ser
        195                 200                 205

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

Val Thr Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu Phe
225                 230                 235                 240

Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser Met
                245                 250                 255

Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg Asp
            260                 265                 270

Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala Asp
        275                 280                 285

Thr Phe Pro Gly Gln Gln Glu Gln Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys Ser
    290                 295                 300

Leu Ala Val Val Leu Ser Trp Ala Cys Val Leu Thr Leu Gly Ala Ile
305                 310                 315                 320

Lys Phe Leu His Trp Ala Gln Leu Phe Ser Ser Trp Lys Gly Ile Thr
                325                 330                 335

Ile Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile Leu
            340                 345                 350

Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Val Pro
        355                 360                 365

Ala Lys Pro Lys Asp Asn His His Pro Glu Ser Ser Ser Gln Thr Glu
    370                 375                 380
```

Thr Glu Lys Glu Lys
385

<210> 64

<211> 281

<212> PRT

<213> *Limnanthes alba*

<400> 64

```
Met Ala Lys Thr Arg Thr Ser Ser Leu Arg Asn Arg Arg Gln Leu Lys
1               5                  10                  15

Thr Ala Val Ala Ala Thr Ala Asp Asp Asp Lys Asp Gly Ile Phe Met
            20                  25                  30

Val Leu Leu Ser Cys Phe Lys Ile Phe Val Cys Phe Ala Ile Val Leu
        35                  40                  45

Ile Thr Ala Val Ala Trp Gly Leu Ile Met Val Leu Leu Leu Pro Trp
    50                  55                  60

Pro Tyr Met Arg Ile Arg Leu Gly Asn Leu Tyr Gly His Ile Ile Gly
65                  70                  75                  80

Gly Leu Val Ile Trp Leu Tyr Gly Ile Pro Ile Glu Ile Gln Gly Ser
                85                  90                  95

Glu His Thr Lys Lys Arg Ala Ile Tyr Ile Ser Asn His Ala Ser Pro
            100                 105                 110

Ile Asp Ala Phe Phe Val Met Trp Leu Ala Pro Ile Gly Thr Val Gly
        115                 120                 125

Val Ala Lys Lys Glu Val Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Gly Gln Leu Tyr
    130                 135                 140

Thr Leu Ala His His Ile Arg Ile Asp Arg Ser Asn Pro Ala Ala Ala
145                 150                 155                 160

Ile Gln Ser Met Lys Glu Ala Val Arg Val Ile Thr Glu Lys Asn Leu
                165                 170                 175

Ser Leu Ile Met Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Gly Asp Gly Arg Leu
            180                 185                 190

Leu Pro Phe Lys Lys Gly Phe Val His Leu Ala Leu Gln Ser His Leu
        195                 200                 205
```

```
Pro Ile Val Pro Met Ile Leu Thr Gly Thr His Leu Ala Trp Arg Lys
    210                 215                 220

Gly Thr Phe Arg Val Arg Pro Val Pro Ile Thr Val Lys Tyr Leu Pro
225                 230                 235                 240

Pro Ile Asn Thr Asp Asp Trp Thr Val Asp Lys Ile Asp Asp Tyr Val
                245                 250                 255

Lys Met Ile His Asp Ile Tyr Val Arg Asn Leu Pro Ala Ser Gln Lys
            260                 265                 270

Pro Leu Gly Ser Thr Asn Arg Ser Lys
        275                 280
```

<210> 65

<211> 303

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 65

```
Met Ser Val Ile Gly Arg Phe Leu Tyr Tyr Leu Arg Ser Val Leu Val
1               5                  10                  15

Val Leu Ala Leu Ala Gly Cys Gly Phe Tyr Gly Val Ile Ala Ser Ile
            20                  25                  30

Leu Cys Thr Leu Ile Gly Lys Gln His Leu Ala Gln Trp Ile Thr Ala
        35                  40                  45

Arg Cys Phe Tyr His Val Met Lys Leu Met Leu Gly Leu Asp Val Lys
    50                  55                  60

Val Val Gly Glu Glu Asn Leu Ala Lys Lys Pro Tyr Ile Met Ile Ala
65                  70                  75                  80

Asn His Gln Ser Thr Leu Asp Ile Phe Met Leu Gly Arg Ile Phe Pro
                85                  90                  95

Pro Gly Cys Thr Val Thr Ala Lys Lys Ser Leu Lys Tyr Val Pro Phe
            100                 105                 110

Leu Gly Trp Phe Met Ala Leu Ser Gly Thr Tyr Phe Leu Asp Arg Ser
        115                 120                 125

Lys Arg Gln Glu Ala Ile Asp Thr Leu Asn Lys Gly Leu Glu Asn Val
    130                 135                 140
```

```
Lys Lys Asn Lys Arg Ala Leu Trp Val Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser
145                 150                 155                 160

Tyr Thr Ser Glu Leu Thr Met Leu Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe His
                165                 170                 175

Leu Ala Gln Gln Gly Lys Ile Pro Ile Val Pro Val Val Val Ser Asn
            180                 185                 190

Thr Ser Thr Leu Val Ser Pro Lys Tyr Gly Val Phe Asn Arg Gly Cys
        195                 200                 205

Met Ile Val Arg Ile Leu Lys Pro Ile Ser Thr Glu Asn Leu Thr Lys
    210                 215                 220

Asp Lys Ile Gly Glu Phe Ala Glu Lys Val Arg Asp Gln Met Val Asp
225                 230                 235                 240

Thr Leu Lys Glu Ile Gly Tyr Ser Pro Ala Ile Asn Asp Thr Thr Leu
                245                 250                 255

Pro Pro Gln Ala Ile Glu Tyr Ala Ala Leu Gln His Asp Lys Lys Val
            260                 265                 270

Asn Lys Lys Ile Lys Asn Glu Pro Val Pro Ser Val Ser Ile Ser Asn
        275                 280                 285

Asp Val Asn Thr His Asn Glu Gly Ser Ser Val Lys Lys Met His
    290                 295                 300
```

<210> 66

<211> 373

<212> PRT

<213> *Micromonas pusilla*

<400> 66

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

Leu Phe Thr Ala Thr Thr Ser Thr Val Thr Met Leu Val Pro Ala Ile
            20                  25                  30

Ile Leu Leu Arg Pro Val Ser Ala Asn Leu Tyr Ala Arg Cys Thr Ser
        35                  40                  45

Trp Ile Phe Ala Cys Trp Trp Thr Ser Cys Leu Phe Ile Thr Glu Arg
    50                  55                  60
```

```
Leu Asn Gly Val Lys Val Arg Val Thr Gly Asp Ala Leu Pro Leu Asn
65                  70                  75                  80

Ala Pro Leu Leu Ile Met Ser Asn His Lys Cys Asn Leu Asp Trp Met
                85                  90                  95

Phe Leu Trp Ser Ser Ala Ile Arg Thr Gly Ser Met Phe His Val Gly
            100                 105                 110

Val Phe Lys Ala Val Ala Lys Ser Glu Ile Arg Val Ile Pro Ile Phe
        115                 120                 125

Gly Trp Gly Cys Lys Leu Asn Gly Phe Ala Tyr Val Arg Arg Arg Trp
    130                 135                 140

Ser Ser Asp Ala Ser His Leu Thr Ser Trp Ile Gln Ser Gln Ile Arg
145                 150                 155                 160

Arg Arg Leu Asn Ala Asn Trp Thr Leu Ile Phe Pro Glu Gly Thr Arg
                165                 170                 175

Tyr Thr Asp Arg Asn Lys Glu Arg Ser Asp Leu Ser Cys Ala Lys Asp
            180                 185                 190

Gly Leu Glu Pro Met Ala Gly Glu Ile Leu Arg Pro Arg Thr Lys Gly
        195                 200                 205

Leu Ala Leu Leu Leu Arg Glu Ser Ala Lys Gly Gly Gly Tyr Tyr Arg
    210                 215                 220

Lys Ile Val Asp Met Thr Ile Gln Tyr Thr Asp Ala Asp Gly Lys Pro
225                 230                 235                 240

Leu Lys Gly Ala Ala Leu Gly Thr Arg Cys Phe Gly Gln Leu Ala Lys
                245                 250                 255

Gly Gln Leu Pro Val Ala Thr Cys His Val His Phe Asp Val Phe Ser
            260                 265                 270

His Lys Asp Val Pro Ala Gly Glu Asp Glu Asp Glu Val Glu Ala Trp
        275                 280                 285

Val Trp Lys Arg Trp Arg Lys Lys Ala Asn Met Leu Glu Ala Cys Ala
    290                 295                 300

Ser Ala Gly Gln Phe Glu Gly Val Arg Glu Trp Ser Thr Ser Gly Thr
```

```
305                 310                 315                 320

Ala Val Pro Leu Lys Thr Gln Thr Ala Leu Arg Cys Phe Phe Val Leu
                325                 330                 335

Gln Gly Leu Val Cys Val Gly Val Ala Cys Ser Ser Thr Ala Phe Leu
            340                 345                 350

Ala Tyr Val Ala Cys Ala Ala Val Gly Ala Ala Val Ile Ala Gln Thr
        355                 360                 365

Asp Pro Ala Trp Trp
    370
```

<210> 67

<211> 314

<212> PRT

<213> *Mortierella alpina*

<400> 67

```
Met Ser Ile Gly Ser Ser Asn Pro Val Leu Leu Ala Ala Ile Pro Phe
1               5                  10                  15

Val Tyr Leu Phe Val Leu Pro Arg Val Leu Ala Phe Leu Pro Gln Lys
            20                  25                  30

Ala Gln Phe Leu Ala Lys Cys Ile Val Val Leu Ile Ala Thr Leu Ile
        35                  40                  45

Met Ser Val Ala Gly Cys Phe Ile Ser Ile Val Cys Ala Leu Leu Asp
    50                  55                  60

Lys Arg Tyr Val Ile Asn Tyr Val Val Ser Arg Leu Phe Ser Phe Leu
65                  70                  75                  80

Ala Ala Arg Pro Cys Gly Val Thr Tyr Lys Ile Val Gly Glu Glu His
                85                  90                  95

Leu Asp Lys Tyr Pro Ala Ile Val Val Cys Asn His Gln Ser Ser Met
            100                 105                 110

Asp Met Met Val Leu Gly Arg Val Phe Pro Lys His Cys Val Val Met
        115                 120                 125

Ala Lys Lys Glu Leu Leu Tyr Phe Pro Phe Leu Gly Met Phe Met Lys
    130                 135                 140

Leu Ser Asn Ala Ile Phe Ile Asp Arg Lys Asn His Lys Lys Ala Ile
```

```
145                 150                 155                 160

Glu Ser Thr Thr Gln Ala Val Ala Asp Met Lys Lys His Asn Ser Gly
                165                 170                 175

Ile Trp Ile Phe Pro Glu Gly Thr Arg Ser Arg Leu Asp Lys Ala Asp
            180                 185                 190

Leu Leu Pro Phe Lys Lys Gly Ala Phe His Leu Ala Ile Gln Ala Gln
        195                 200                 205

Leu Pro Ile Leu Pro Ile Ile Ser Gln Gly Tyr Ser His Ile Tyr Asp
    210                 215                 220

Ser Ser Lys Arg Tyr Phe Pro Gly Gly Glu Leu Glu Ile Arg Val Leu
225                 230                 235                 240

Glu Pro Ile Pro Thr Thr Gly Leu Thr Thr Asp Asp Val Asn Asp Leu
                245                 250                 255

Met Asp Lys Thr Arg Asn Leu Met Leu Lys His Leu Lys Glu Met Asp
            260                 265                 270

Ser Gln Tyr Ser Ser Ser Thr Ala Glu Asn Gly Ser Thr His Ile Asp
        275                 280                 285

Ala Asp Ile Ala Lys Ser Thr Ala Thr Ser Ile Gly Asn Thr Asp Asp
    290                 295                 300

Ala Ile Thr Lys Arg Arg Thr Pro Lys Glu
305                 310
```

<210> 68

<211> 391

<212> PRT

<213> *Braccisa napus*

<400> 68

```
Met Ala Met Ala Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Ile Leu Phe
1               5                  10                  15

Phe Ile Ser Gly Leu Val Val Asn Leu Leu Gln Ala Val Cys Tyr Val
            20                  25                  30

Leu Ile Arg Pro Leu Ser Lys Asn Thr Tyr Arg Lys Ile Asn Arg Val
        35                  40                  45

Val Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp
```

```
    50                  55                  60

Ala Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asp Glu Thr Phe Asn Arg
65                  70                  75                  80

Met Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile
                85                  90                  95

Asp Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly
            100                 105                 110

Ser Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile
        115                 120                 125

Gly Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp
    130                 135                 140

Ala Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Asn Asp
145                 150                 155                 160

Phe Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe
                165                 170                 175

Thr Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Gln
            180                 185                 190

Leu Pro Val Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val
        195                 200                 205

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

Thr Val Ala Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu
225                 230                 235                 240

Phe Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser
                245                 250                 255

Met Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg
            260                 265                 270

Asp Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala
        275                 280                 285

Asp Thr Phe Pro Gly Gln Lys Glu His Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys
    290                 295                 300
```

```
Ser Leu Ala Val Val Val Ser Trp Ala Cys Leu Leu Thr Leu Gly Ala
305                 310                 315                 320

Met Lys Phe Leu His Trp Ser Asn Leu Phe Ser Ser Leu Lys Gly Ile
                325                 330                 335

Ala Leu Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile
            340                 345                 350

Leu Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Ala
        355                 360                 365

Pro Ala Lys Pro Lys Asp Lys His Gln Ser Gly Ser Ser Ser Gln Thr
    370                 375                 380

Glu Val Glu Glu Lys Gln Lys
385                 390
```

<210> 69

<211> 390

<212> PRT

<213> *Braccisa napus*

<400> 69

```
Met Ala Met Ala Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Ile Leu Phe Phe
1               5                  10                  15

Ile Ser Gly Leu Val Val Asn Leu Leu Gln Ala Ile Cys Tyr Val Leu
            20                  25                  30

Ile Arg Pro Leu Ser Lys Asn Thr Tyr Arg Lys Ile Asn Arg Val Val
        35                  40                  45

Ala Glu Thr Leu Trp Leu Glu Leu Val Trp Ile Val Asp Trp Trp Ala
    50                  55                  60

Gly Val Lys Ile Gln Val Phe Ala Asp Asn Glu Thr Phe Asn Arg Met
65                  70                  75                  80

Gly Lys Glu His Ala Leu Val Val Cys Asn His Arg Ser Asp Ile Asp
                85                  90                  95

Trp Leu Val Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly Ser
            100                 105                 110

Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile Gly
        115                 120                 125
```

```
Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp Ala
    130                 135                 140

Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Asn Asp Phe
145                 150                 155                 160

Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe Thr
                165                 170                 175

Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Leu
            180                 185                 190

Pro Val Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val Ser
        195                 200                 205

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

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

Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser Met
                245                 250                 255

Lys Asp Leu Pro Glu Ser Asp Asp Ala Ile Ala Gln Trp Cys Arg Asp
            260                 265                 270

Gln Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala Asp
        275                 280                 285

Thr Phe Pro Gly Gln Gln Glu Gln Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys Ser
    290                 295                 300

Leu Ala Val Val Leu Ser Trp Ser Cys Leu Leu Ile Leu Gly Ala Met
305                 310                 315                 320

Lys Phe Leu His Trp Ser Asn Leu Phe Ser Ser Trp Lys Gly Ile Ala
                325                 330                 335

Phe Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile Leu
            340                 345                 350

Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Val Pro
        355                 360                 365

Ala Lys Pro Lys Asp Asn His Asn Asp Ser Gly Ser Ser Ser Gln Thr
    370                 375                 380
```

Glu Val Glu Lys Gln Lys
385 390

<210> 70

<211> 361

<212> PRT

<213> *Phytophthora infestans*

<400> 70

```
Met Ala Thr Lys Glu Ala Tyr Val Phe Pro Thr Leu Thr Glu Ile Lys
1               5                  10                  15

Arg Ser Leu Pro Lys Asp Cys Phe Glu Ala Ser Val Pro Leu Ser Leu
            20                  25                  30

Tyr Tyr Thr Val Arg Cys Leu Val Ile Ala Val Ala Leu Thr Phe Gly
        35                  40                  45

Leu Asn Tyr Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Glu Ser Phe Trp Ala Leu
    50                  55                  60

Asp Ala Ala Leu Cys Thr Gly Tyr Ile Leu Leu Gln Gly Ile Val Phe
65                  70                  75                  80

Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Ala Gly His Gly Ala Phe Ser
                85                  90                  95

Arg Tyr His Leu Leu Asn Phe Val Val Gly Thr Phe Met His Ser Leu
            100                 105                 110

Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu Thr His Arg His His His
        115                 120                 125

Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Arg Asp Glu Val Phe Tyr Pro Gln Arg
    130                 135                 140

Lys Ala Asp Asp His Pro Leu Ser Arg Asn Leu Ile Leu Ala Leu Gly
145                 150                 155                 160

Ala Ala Trp Leu Ala Tyr Leu Val Glu Gly Phe Pro Pro Arg Lys Val
                165                 170                 175

Asn His Phe Asn Pro Phe Glu Pro Leu Phe Val Arg Gln Val Ser Ala
            180                 185                 190

Val Val Ile Ser Leu Leu Ala His Phe Phe Val Ala Gly Leu Ser Ile
        195                 200                 205
```

```
Tyr Leu Ser Leu Gln Leu Gly Leu Lys Thr Met Ala Ile Tyr Tyr Tyr
    210                 215                 220

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

His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr Ala Asp Ser Glu Trp Thr
                245                 250                 255

Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp Arg Ser Tyr Gly Ala Leu
            260                 265                 270

Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr His Gln Ile His His Leu
        275                 280                 285

Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Lys Lys Ala Thr Ala Ala Phe
    290                 295                 300

His Gln Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys Ser Asp Glu Pro Ile Ile
305                 310                 315                 320

Lys Ala Phe Phe Arg Val Gly Arg Leu Tyr Ala Asn Tyr Gly Val Val
                325                 330                 335

Asp Gln Glu Ala Lys Leu Phe Thr Leu Lys Glu Ala Lys Ala Ala Thr
            340                 345                 350

Glu Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Thr
        355                 360
```

<210> 71

<211> 418

<212> PRT

<213> *Thalassiosira pseudonana*

<400> 71

```
Met Tyr Arg Leu Thr Ser Thr Phe Leu Ile Ala Leu Ala Phe Ser Ser
1               5                  10                  15

Ser Ile Asn Ala Phe Ser Pro Gln Arg Pro Pro Arg Thr Ile Thr Lys
            20                  25                  30

Ser Lys Val Gln Ser Thr Val Leu Pro Ile Pro Thr Lys Asp Asp Leu
        35                  40                  45

Asn Phe Leu Gln Pro Gln Leu Asp Glu Asn Asp Leu Tyr Leu Asp Asp
    50                  55                  60
```

```
Val Asn Thr Pro Pro Arg Ala Gly Thr Ile Met Lys Met Leu Pro Lys
65                  70                  75                  80

Glu Thr Phe Asn Ile Asp Thr Ala Thr Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Met
                85                  90                  95

Asp Met Ala Ala Val Val Ser Ser Met Thr Leu Leu Asn Ala Ile Val
            100                 105                 110

Thr Ser Asp Gln Tyr His Ala Leu Pro Leu Pro Leu Gln Ala Ala Thr
        115                 120                 125

Val Ile Pro Phe Gln Leu Leu Ala Gly Phe Ala Met Trp Cys Met Trp
    130                 135                 140

Cys Ile Gly His Asp Ala Gly His Ser Thr Val Ser Lys Thr Lys Trp
145                 150                 155                 160

Ile Asn Arg Val Val Gly Glu Val Ala His Ser Val Val Cys Leu Thr
                165                 170                 175

Pro Phe Val Pro Trp Gln Met Ser His Arg Lys His His Leu Asn His
            180                 185                 190

Asn His Ile Glu Lys Asp Tyr Ser His Lys Trp Tyr Ser Arg Asp Glu
        195                 200                 205

Phe Asp Asp Ile Pro Gln Leu Tyr Lys Thr Phe Gly Tyr Asn Pro Arg
    210                 215                 220

Met Met Gln Leu Pro Phe Leu Tyr Phe Met Tyr Leu Ala Leu Gly Ile
225                 230                 235                 240

Pro Asp Gly Gly His Val Val Phe Tyr Gly Arg Met Trp Glu Gly Val
                245                 250                 255

Ser Leu Gln Lys Lys Phe Asp Ala Ala Ile Ser Val Ala Val Ser Cys
            260                 265                 270

Ala Thr Ala Gly Ser Leu Trp Met Asn Met Gly Thr Ala Asp Phe Thr
        275                 280                 285

Val Val Cys Met Val Pro Trp Leu Val Leu Ser Trp Trp Leu Phe Met
    290                 295                 300

Val Thr Tyr Leu Gln His His Ser Glu Asp Gly Lys Leu Tyr Thr Asp
305                 310                 315                 320
```

Glu Thr Phe Thr Phe Glu Lys Gly Ala Phe Glu Thr Val Asp Arg Ser
325 330 335

Tyr Gly Lys Leu Ile Asn Arg Met Ser His His Met Met Asp Gly His
340 345 350

Val Val His His Leu Phe Phe Glu Arg Val Pro His Tyr Arg Leu Glu
355 360 365

Ala Ala Thr Glu Ala Leu Val Lys Gly Met Asp Glu Thr Gly Gln Lys
370 375 380

His Leu Tyr Lys Tyr Ile Asp Thr Pro Asp Phe Asn Ala Glu Ile Val
385 390 395 400

Asn Gly Phe Arg Asp Asn Trp Phe Leu Val Glu Glu Glu Asn Ile Lys
405 410 415

Arg Glu

<210> 72

<211> 363

<212> PRT

<213> *Pythium irregulare*

<400> 72

```
Met Ala Ser Thr Ser Ala Ala Gln Asp Ala Ala Pro Tyr Glu Phe Pro
1               5                  10                  15

Ser Leu Thr Glu Ile Lys Arg Ala Leu Pro Ser Glu Cys Phe Glu Ala
            20                  25                  30

Ser Val Pro Leu Ser Leu Tyr Tyr Thr Ala Arg Ser Leu Ala Leu Ala
        35                  40                  45

Gly Ser Leu Ala Val Ala Leu Ser Tyr Ala Arg Ala Leu Pro Leu Val
    50                  55                  60

Gln Ala Asn Ala Leu Leu Asp Ala Thr Leu Cys Thr Gly Tyr Val Leu
65                  70                  75                  80

Leu Gln Gly Ile Val Phe Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Cys
                85                  90                  95

Gly His Gly Ala Phe Ser Arg Ser His Val Leu Asn Phe Ser Val Gly
            100                 105                 110
```

```
Thr Leu Met His Ser Ile Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu
        115                 120                 125

Ser His Arg His His His Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Lys Asp Glu
    130                 135                 140

Ile Phe Tyr Pro Gln Arg Glu Ala Asp Ser His Pro Val Ser Arg His
145                 150                 155                 160

Leu Val Met Ser Leu Gly Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Leu Phe Ala Gly
                165                 170                 175

Phe Pro Pro Arg Thr Met Asn His Phe Asn Pro Trp Glu Ala Met Tyr
            180                 185                 190

Val Arg Arg Val Ala Ala Val Ile Ile Ser Leu Gly Val Leu Phe Ala
        195                 200                 205

Phe Ala Gly Leu Tyr Ser Tyr Leu Thr Phe Val Leu Gly Phe Thr Thr
    210                 215                 220

Met Ala Ile Tyr Tyr Phe Gly Pro Leu Phe Ile Phe Ala Thr Met Leu
225                 230                 235                 240

Val Val Thr Thr Phe Leu His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr
                245                 250                 255

Ala Asp Ser Glu Trp Thr Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp
            260                 265                 270

Arg Ser Tyr Gly Ala Leu Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr
        275                 280                 285

His Gln Ile His His Leu Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Asn
    290                 295                 300

Asp Ala Thr Ala Ala Phe Ala Lys Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys
305                 310                 315                 320

Asn Ala Ala Pro Ile Ile Pro Thr Phe Phe Arg Met Ala Ala Met Tyr
                325                 330                 335

Ala Lys Tyr Gly Val Val Asp Thr Asp Ala Lys Thr Phe Thr Leu Lys
            340                 345                 350

Glu Ala Lys Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Ser
```

DOCUMENTOSÓREFERIDOSÓNAÓDESCRIÇÃOÓÓ

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

DocumentosÓdeÓpatenteÓreferidosÓnaÓdescriçãoÓ

- ÓWO 04017467 A **[0010]Ó**
- ÓWO 2004071467 A **[0010]Ó**
- ÓWO 2005103253 A **[0010]Ó[0156]Ó**
- ÓWO 02081668 A **[0136]Ó**
- ÓWO 03078639 A **[0136]Ó**
- ÓWO 03093482 A **[0136]Ó**
- ÓWO 0159128 A **[0136]Ó**
- ÓWO 0208401 A2 **[0136]Ó**
- ÓWO 08128241 A **[0136]Ó**
- ÓWO 2010057246 A **[0136]Ó[0234]Ó[0236]Ó[0278]Ó[0315]Ó[0360]Ó[0361]Ó[0362]Ó**
- ÓWO 06008099 A **[0136]Ó**
- ÓWO 2008054565 A **[0140]Ó**
- ÓWO 2005083053 A **[0143]Ó**
- ÓUS 7211656 B **[0143]Ó[0150]Ó**
- ÓWO 2008022963 A **[0143]Ó**
- ÓWO 2006019192 A **[0143]Ó**
- ÓWO 2005012316 A **[0143]Ó[0150]Ó[0385]Ó**
- ÓUS 5952544 A **[0148]Ó**
- ÓWO 200114538 A **[0148]Ó**
- ÓWO 2009016202 A **[0150]Ó**
- ÓWO 2003099216 A **[0150]Ó**
- ÓWO 2007133425 A **[0150]Ó**
- ÓWO 2007042510 A **[0151]Ó**
- ÓUS 2010088776 A **[0156]Ó**
- ÓEP 256223 A **[0190]Ó**
- ÓWO 8705327 A **[0190]Ó**

•ÓEP 275957 A **[0190]**Ó
•ÓWO 9102071 A **[0190]**Ó
•ÓEP 154204 A **[0190]**Ó
•ÓWO 9706269 A **[0197]**Ó
•ÓUS 5608152 A **[0199]**Ó
•ÓWO 9845461 A **[0199]**Ó
•ÓUS 5504200 A **[0199]**Ó
•ÓWO 9113980 A **[0199]**Ó
•ÓWO 9515389 A **[0199]**Ó
•ÓWO 9523230 A **[0199]**Ó
•ÓWO 9916890 A **[0199]**Ó
•ÓUS 20070192902 A **[0199]**Ó
•ÓUS 20030159173 A **[0199]**Ó
•ÓUS 5362865 A **[0200]**Ó
•ÓUS 5859347 A **[0200]**Ó
•ÓUS 5177010 A **[0222]**Ó
•ÓUS 5104310 A **[0222]**Ó
•ÓUS 5004863 A **[0222]**Ó
•ÓUS 5159135 A **[0222]**Ó
•ÓUS 5451513 A **[0224]**Ó
•ÓUS 5545818 A **[0224]**Ó
•ÓUS 5877402 A **[0224]**Ó
•ÓUS 5932479 A **[0224]**Ó
•ÓWO 9905265 A **[0224]**Ó
•ÓUS 7879591 B **[0376]**Ó**[0377]**Ó
•ÓUS 61660392 B **[0383]**Ó**[0386]**Ó
•ÓUS 61663344 B **[0383]**Ó**[0386]**Ó
•ÓUS 61697676 B **[0383]**Ó**[0386]**Ó
•ÓUS 61782680 B **[0383]**Ó**[0386]**Ó
•ÓEP 13803782 A **[0386]**

DocumentosÓdeÓnãoÓpatenteÓcitadosÓnaÓdescrição

•Ó**J.ÓPERBAL.Ó**A Practical Guide to Molecular Cloning. John Wiley and Sons, 1984 **[0113]**ÓÓ
•Ó **J.Ó SAMBROOKÓ etÓ al.Ó** Molecular Cloning: A Laboratory

Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989 **[0113]**ŐŐ
•Ő Essential Molecular Biology: A Practical Approach. IRL Press, 1991, vol. 1 and 2 **[0113]**ŐŐ
•ŐDNA Cloning: A Practical Approach. IRL Press, 1995, vol. 1-4 **[0113]**ŐŐ
•Ő Current Protocols in Molecular Biology. Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, 1988 **[0113]**ŐŐ
•Ő Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory, 1988 **[0113]**ŐŐ
•ŐCurrent Protocols in Immunology. John Wiley & Sons **[0113]**ŐŐ
•Ő**POUWELS**Ő**et**Ő**al.**Ő*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985 **[0194]**ŐŐ
•Ő **WEISSBACH**Ő **;**Ő **WEISSBACH.**Ő Methods for Plant Molecular Biology. Academic Press, 1989 **[0194]**ŐŐ
•Ő **GELVIN**Ő **et**Ő **al.**Ő Plant Molecular Biology Manual. Kluwer Academic Publishers, 1990 **[0194]**ŐŐ
•Ő **A.**Ő **SLATER**Ő **et**Ő **al.**Ő Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants. Oxford University Press, 2003 **[0220]**ŐŐ
•Ő**P.**Ő**CHRISTOU**Ő**;**Ő**H.**Ő**KLEE.**ŐHandbook of Plant Biotechnology. John Wiley and Sons, 2004 **[0220]**ŐŐ
•Ő **KLEE**Ő **et**Ő **al.**Ő Plant DNA Infectious Agents. Springer-Verlag, 1985, 179-203 **[0222]**ŐŐ
•Ő **YANG**Ő **et**Ő **al.**Ő Particle Bombardment Technology for Gene Transfer. Oxford Press, 1994 **[0223]**ŐŐ
•Ő **WEISSBACH**Ő **et**Ő **al.**Ő Methods for Plant Molecular Biology. Academic Press, 1988 **[0226]**ŐŐ
•Ő**FEHR.**ŐBreeding Methods for Cultivar Development. American Society of Agronomy, 1987 **[0230]**ŐŐ
•Ő**ABBADI**Ő**et**Ő**al.**Ő*Plant Cell*, 2004, vol. 16, 2734-2748 **[0385]**ŐŐ
•Ő**ABBOTT**Ő**et**Ő**al.**Ő*Science*, 1998, vol. 282, 2012-2018 **[0385]**ŐŐ
•Ő**ABDULLAH**Ő**et**Ő**al.**Ő*Biotech.*, 1986, vol. 4, 1087 **[0385]**ŐŐ
•Ő **AGABA**Ő **et**Ő **al.**Ő *Marine Biotechnol.*, 2004, vol. 6, 251-261 **[0385]**ŐŐ
•Ő**ALVAREZ**Ő**et**Ő**al.**Ő*Theor Appl Genet*, 2000, vol. 100, 319-327

[0385]ŐŐ
•ŐARMBRUSTŐetŐal.ŐScience, 2004, vol. 306, 79-86 [0385]ŐŐ
•Ő ATTILAŐ KERESZTŐ etŐ al.Ő Nature Protocols, 2007, vol. 2, 948-952 [0385]ŐŐ
•Ő BAUMBERGERŐ etŐ al.Ő Curr. Biol., 2007, vol. 17, 1609-1614 [0385]ŐŐ
•ŐBAUMLEINŐetŐal.ŐMol. Gen. Genet., 1991, vol. 225, 459-467 [0385]ŐŐ
•ŐBAUMLEINŐetŐal.ŐPlant J., 1992, vol. 2, 233-239 [0385]ŐŐ
•ŐBEAUDOINŐetŐal.ŐProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, vol. 97, 6421-6426 [0385]ŐŐ
•ŐBECLINŐetŐal.ŐCurr. Biol., 2002, vol. 12, 684-688 [0385]ŐŐ
•ŐBERBERICHŐetŐal.ŐPlant Mol. Biol., 1998, vol. 36, 297-306 [0385]ŐŐ
•ŐBORTOLAMIOLŐetŐal.ŐCurr. Biol., 2007, vol. 17, 1615-1621 [0385]ŐŐ
•ŐBROUNŐetŐal.ŐPlant J., 1998, vol. 13, 201-210 [0385]ŐŐ
•ŐBROWNŐetŐal.ŐBiochem J., 2002, vol. 364, 795-805 [0385]ŐŐ
•ŐCHAPMANŐetŐal.ŐGen. Dev., 2004, vol. 18, 1179-1186 [0385]ŐŐ
•Ő CHENŐ etŐ al.Ő The Plant Cell, 2004, vol. 16, 1302-1313 [0385]ŐŐ
•Ő CHENGŐ etŐ al.Ő Plant Cell Rep., 1996, vol. 15, 653-657 [0385]ŐŐ
•Ő CHENGŐ etŐ al.Ő Transgenic Res, 2010, vol. 19, 221-229 [0385]ŐŐ
•Ő CHIKWAMBAŐ etŐ al.Ő Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2003, vol. 100, 11127-11132 [0385]ŐŐ
•ŐCHOŐetŐal.ŐJ. Biol. Chem., 1999, vol. 274, 471-477 [0385]ŐŐ
•Ő CHOŐ etŐ al.Ő J. Biol. Chem., 1999, vol. 274, 37335-37339 [0385]ŐŐ
•ŐCLOUGH;ŐBENT.ŐPlant J., 1998, vol. 16, 735-43 [0385]ŐŐ
•Ő COUTUŐ etŐ al.Ő Transgenic Res., 2007, vol. 16, 771-781 [0385]ŐŐ
•Ő DAMUDEŐ etŐ al.Ő Proc Natl Acad Sci USA, 2006, vol. 103, 9446-9451 [0385]ŐŐ

•ŐDENIC;ŐWEISSMAN.Ő*Cell*, 2007, vol. 130, 663-677 **[0385]**ŐŐ
•Ő**DOMERGUE**Ő**et**Ő**al.**Ő*Eur. J. Biochem.*, 2002, vol. 269, 4105-4113 **[0385]**ŐŐ
•Ő**DOMERGUE**Ő**et**Ő**al.**Ő*J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, 35115-35126 **[0385]**ŐŐ
•Ő **DOMERGUE**Ő **et**Ő **al.**Ő *Biochem. J.*, 2005, vol. 1389, 483-490 **[0385]**ŐŐ
•Ő**DUNOYER**Ő**et**Ő**al.**Ő*The Plant Cell*, 2004, vol. 16, 1235-1250 **[0385]**ŐŐ
•Ő**ELLERSTROM**Ő**et**Ő**al.**Ő*Plant Mol. Biol.*, 1996, vol. 32, 1019-1027 **[0385]**ŐŐ
•Ő**FUJIMURA**Ő**et**Ő**al.**Ő*Plant Tissue Culture Lett.*, 1985, vol. 2, 74 **[0385]**ŐŐ
•Ő**FUKUNAGA.**Ő*EMBO J.*, 2009, vol. 28, 545-55 **[0385]**ŐŐ
•Ő**GAMEZ**Ő**et**Ő**al.**Ő*Food Res International*, 2003, vol. 36, 721-727 **[0385]**ŐŐ
•Ő **GARCIA-MAROTO**Ő **et**Ő **al.**Ő *Lipids*, 2002, vol. 37, 417-426 **[0385]**ŐŐ
•Ő**GIRKE**Ő**et**Ő**al.**Ő*Plant J.*, 1998, vol. 15, 39-48 **[0385]**ŐŐ
•Ő**GLICK**Ő**et**Ő**al.**Ő*Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 2008, 105-157, 161 **[0385]**ŐŐ
•Ő **GRANT**Ő **et**Ő **al.**Ő *Plant Cell Rep.*, 1995, vol. 15, 254-258 **[0385]**ŐŐ
•Ő**HALL**Ő**et**Ő**al.**Ő*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 9320-9324 **[0385]**ŐŐ
•Ő **HAMILTON**Ő **;**Ő **BAULCOMBE.**Ő *Science*, 1999, vol. 286, 950-952 **[0385]**ŐŐ
•Ő**HAMILTON**Ő**et**Ő**al.**Ő*Gene*, 1997, vol. 200, 107-16 **[0385]**ŐŐ
•Ő**HARAYAMA.**Ő*Trends Biotechnol.*, 1998, vol. 16, 76-82 **[0385]**ŐŐ
•Ő**HASTINGS**Ő**et**Ő**al.**Ő*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001, vol. 98, 14304-14309 **[0385]**ŐŐ
•Ő **HINCHEE**Ő **et**Ő **al.**Ő *Biotechnology*, 1988, vol. 6, 915-922 **[0385]**ŐŐ
•Ő **HOFFMANN**Ő **et**Ő **al.**Ő *J Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, 22352-22362 **[0385]**ŐŐ

•ŐHONGŐetŐal.ŐLipids, 2002, vol. 37, 863-868 [0385]ŐŐ
•ŐHORIGUCHIŐetŐal.ŐPlant Cell Physiol., 1998, vol. 39, 540-544 [0385]ŐŐ
•ŐHORVATHŐetŐal.ŐProc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000, vol. 97, 1914-1919 [0385]ŐŐ
•ŐHUANGŐetŐal.ŐLipids, 1999, vol. 34, 649-659 [0385]ŐŐ
•Ő INAGAKIŐ etŐ al.Ő Biosci. Biotechnol. Biochem., 2002, vol. 66, 613-621 [0385]ŐŐ
•ŐJOHANSENŐ;ŐCARRINGTON.ŐPlant Physiol., 2001, 126-930, 938 [0385]ŐŐ
•Ő KAJIKAWAŐ etŐ al.Ő Plant Mol. Biol., 2004, vol. 54, 335-52 [0385]ŐŐ
•ŐKAJIKAWAŐetŐal.ŐFEBS Lett, 2006, vol. 580, 149-154 [0385]ŐŐ
•ŐKIMŐetŐal.ŐPlant Cell, 2005, vol. 2005, 1073-89 [0385]ŐŐ
•Ő KNUTZONŐ etŐ al.Ő J. Biol Chem., 1998, vol. 273, 29360-6 [0385]ŐŐ
•Ő KOZIELŐ etŐ al.Ő Plant Mol. Biol., 1996, vol. 32, 393-405 [0385]ŐŐ
•ŐLASSNER.ŐPlant Physiol., 1995, vol. 109, 1389-94 [0385]ŐŐ
•Ő LEONARDŐ etŐ al.Ő Biochem. J., 2000, vol. 347, 719-724 [0385]ŐŐ
•Ő LEONARDŐ etŐ al.Ő Biochem. J., 2000, vol. 350, 765-770 [0385]ŐŐ
•ŐLEONARDŐetŐal.ŐLipids, 2002, vol. 37, 733-740 [0385]ŐŐ
•ŐLEWSEYŐetŐal.ŐPlant J., 2007, vol. 50, 240-252 [0385]ŐŐ
•ŐLOŐetŐal.ŐGenome Res., 2003, vol. 13, 455-466 [0385]ŐŐ
•ŐLU;ŐKANG.ŐPlant Cell Rep., 2008, vol. 27, 273-8 [0385]ŐŐ
•Ő MALLORYŐ etŐ al.Ő Nat. Biotech., 2002, vol. 20, 622-625 [0385]ŐŐ
•ŐMARANGONIŐetŐal.ŐTrends in Food Sci. Technol., 1995, vol. 6, 329-335 [0385]ŐŐ
•ŐMEESAPYODSUKŐetŐal.ŐJ Biol Chem, 2007, vol. 282, 20191-20199 [0385]ŐŐ
•Ő MENGŐ etŐ al.Ő J. Gen. Virol., 2008, vol. 89, 2349-2358 [0385]ŐŐ

•ÓMEYERÓetÓal.ÓBiochem., 2003, vol. 42, 9779-9788 [0385]ÓÓ
•ÓMEYERÓetÓal.ÓLipid Res, 2004, vol. 45, 1899-1909 [0385]ÓÓ
•ÓMICHAELSONÓetÓal.ÓJ. Biol. Chem., 1998, vol. 273, 19055-19059 [0385]ÓÓ
•Ó MICHAELSONÓ etÓ al.Ó FEBS Lett., 1998, vol. 439, 215-218 [0385]ÓÓ
•ÓMURASHIGEÓ;ÓSKOOG.ÓPhysiologia Plantarum, 1962, vol. 15, 473-497 [0385]ÓÓ
•ÓNAPIERÓetÓal.ÓBiochem. J., 1998, vol. 330, 611-614 [0385]ÓÓ
•ÓNEEDLEMANÓ;ÓWUNSCH.ÓJ. Mol. Biol., 1970, vol. 48, 443-453 [0385]ÓÓ
•Ó NIEDZÓ etÓ al.Ó Plant Cell Reports, 1995, vol. 14, 403 [0385]ÓÓ
•ÓOWÓetÓal.ÓScience, 1986, vol. 234, 856-859 [0385]ÓÓ
•Ó PARKER-BARNESÓ etÓ al.Ó Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, 8284-8289 [0385]ÓÓ
•Ó PEREIRAÓ etÓ al.Ó Biochem. J., 2004, vol. 378, 665-671 [0385]ÓÓ
•Ó PEREIRAÓ etÓ al.Ó Biochem. J., 2004, vol. 384, 357-366 [0385]ÓÓ
•ÓPERRINÓetÓal.ÓMol Breed, 2000, vol. 6, 345-352 [0385]ÓÓ
•ÓPETRIEÓetÓal.ÓMetab. Eng., 2010, vol. 12, 233-240 [0385]ÓÓ
•ÓPETRIEÓetÓal.ÓPlant Methods, 2010, vol. 11 (6É, 8 [0385]ÓÓ
•Ó PETRIEÓ etÓ al.Ó Transgenic Res., 2012, vol. 21, 139-147 [0385]ÓÓ
•ÓPOTENZAÓetÓal.ÓIn Vitro Cell Dev Biol - Plant, 2004, vol. 40, 1-22 [0385]ÓÓ
•ÓPRASHERÓetÓal.ÓBiochem. Biophys. Res. Commun., 1985, vol. 127, 31-36 [0385]ÓÓ
•ÓQIÓetÓal.ÓFEBS Lett., 2002, vol. 510, 159-165 [0385]ÓÓ
•ÓQIÓetÓal.ÓNat. Biotech., 2004, vol. 22, 739-745 [0385]ÓÓ
•Ó QIUÓ etÓ al.Ó J. Biol. Chem., 2001, vol. 276, 31561-31566 [0385]ÓÓ
•Ó REDDYÓ ;Ó THOMAS.Ó Nat. Biotech., 1996, vol. 14, 639-642 [0385]ÓÓ

•Ő **REDDY**Ő **et**Ő **al.**Ő *Plant Mol. Biol.*, 1993, vol. 22, 293-300 **[0385]**ŐŐ
•Ő **ROBERT**Ő **et**Ő **al.**Ő *Func. Plant Biol.*, 2005, vol. 32, 473-479 **[0385]**ŐŐ
•Ő **ROBERT**Ő **et**Ő **al.**Ő *Marine Biotech,* 2009, vol. 11, 410-418 **[0385]**ŐŐ
•Ő **RUIZ-LOPEZ**Ő **et**Ő **al.**Ő *Transgenic Res.*, 2012, vol. 21, 139-147 **[0385]**ŐŐ
•Ő **SAHA**Ő **et**Ő **al.**Ő *Plant Physiol.*, 2006, vol. 141, 1533-1543 **[0385]**ŐŐ
•Ő **SAITO**Ő **et**Ő **al.**Ő *Eur. J. Biochem.*, 2000, vol. 267, 1813-1818 **[0385]**ŐŐ
•Ő **SAKURADANI**Ő **et**Ő **al.**Ő *Gene,* 1999, vol. 238, 445-453 **[0385]**ŐŐ
•Ő **SATO**Ő **et**Ő **al.**Ő *Crop Sci.*, 2004, vol. 44, 646-652 **[0385]**ŐŐ
•Ő **SAKURADANI**Ő **et**Ő **al.**Ő *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, vol. 66, 648-654 **[0385]**ŐŐ
•Ő **SAYANOVA**Ő **et**Ő **al.**Ő *J Biol Chem,* 2006, vol. 281, 36533-36541 **[0385]**ŐŐ
•Ő **SAYANOVA**Ő **et**Ő **al.**Ő *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, vol. 94, 4211-4216 **[0385]**ŐŐ
•Ő **SAYANOVA**Ő **et**Ő **al.**Ő *FEBS Lett.*, 2003, vol. 542, 100-104 **[0385]**ŐŐ
•Ő **SAYANOVA**Ő **et**Ő **al.**Ő *Planta,* 2006, vol. 224, 1269-1277 **[0385]**ŐŐ
•Ő **SAYANOVA**Ő **et**Ő **al.**Ő *Plant Physiol,* 2007, vol. 144, 455-467 **[0385]**ŐŐ
•Ő **SINGH**Ő **et**Ő **al.**Ő *Curr. Opin. in Plant Biol.*, 2005, vol. 8, 197-203 **[0385]**ŐŐ
•Ő **SPERANZA**Ő **et**Ő **al.**Ő *Process Biochemistry,* 2012 **[0385]**ŐŐ
•Ő **SPERLING**Ő **et**Ő **al.**Ő *Eur. J. Biochem.*, 2000, vol. 267, 3801-3811 **[0385]**ŐŐ
•Ő **SPERLING**Ő **et**Ő **al.**Ő *Arch. Biochm. Biophys.*, 2001, vol. 388, 293-8 **[0385]**ŐŐ
•Ő **SPRECHER**Ő **et**Ő **al.**Ő *J. Lipid Res.*, 1995, vol. 36, 2471-2477 **[0385]**ŐŐ
•Ő **SPYCHALLA**Ő **et**Ő **al.**Ő *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997,

vol. 94, 1142-1147 [0385]ÓÓ
•ÓSTALKERÓetÓal.Ó*J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 263, 6310-6314 [0385]ÓÓ
•ÓTHILLETÓetÓal.Ó*J. Biol. Chem*, 1988, vol. 263, 12500-12508 [0385]ÓÓ
•ÓTONONÓetÓal.Ó*FEBS Lett.*, 2003, vol. 553, 440-444 [0385]ÓÓ
•Ó TORIYAMAÓ etÓ al.Ó *Theor. Appl. Genet.*, 1986, vol. 205, 34 [0385]ÓÓ
•Ó TRAUTWEIN.Ó *European J. Lipid Sci. and Tech.*, 2001, vol. 103, 45-55 [0385]ÓÓ
•ÓTVRDIK.Ó*J. Cell Biol.*, 2000, vol. 149, 707-718 [0385]ÓÓ
•Ó VENEGAS-CALERONÓ etÓ al.Ó *Prog. Lipid Res.*, 2010, vol. 49, 108-119 [0385]ÓÓ
•ÓVOINNETÓetÓal.Ó*Plant J.*, 2003, vol. 33, 949-956 [0385]ÓÓ
•ÓWALLISÓ;ÓBROWSE.Ó*Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, vol. 365, 307-316 [0385]ÓÓ
•ÓWATTSÓ;ÓBROWSE.Ó*Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, vol. 362, 175-182 [0385]ÓÓ
•Ó WEISSÓ etÓ al.Ó *Int. J. Med. Microbiol.*, 2003, vol. 293 (95É, 106 [0385]ÓÓ
•ÓWHITNEYÓetÓal.Ó*Planta*, 2003, vol. 217, 983-992 [0385]ÓÓ
•ÓWINANS.Ó*J. Bacteriol.*, 1988, vol. 170, 4047-54 [0385]ÓÓ
•ÓWOOD.Ó*Plant Biotechnol J.*, 2009, vol. 7, 914-24 [0385]ÓÓ
•ÓWUÓetÓal.Ó*Nat. Biotech.*, 2005, vol. 23, 1013-1017 [0385]ÓÓ
•ÓYANGÓetÓal.Ó*Planta*, 2003, vol. 216, 597-603 [0385]ÓÓ
•ÓZANKÓetÓal.Ó*Plant J.*, 2002, vol. 31, 255-268 [0385]ÓÓ
•ÓZHANGÓetÓal.Ó*FEBS Lett.*, 2004, vol. 556, 81-85 [0385]ÓÓ
•ÓZHANGÓetÓal.Ó*FEBS Letters*, 2007, vol. 581, 315-319 [0385]ÓÓ
•ÓZHANGÓetÓal.Ó*Yeast*, 2008, vol. 25, 21-27 [0385]ÓÓ
•ÓZHOUÓetÓal.Ó*Phytochem.*, 2007, vol. 68, 785-796 [0385]ÓÓ
•Ó ZHOUÓ etÓ al.Ó *Insect Mol Biol*, 2008, vol. 17, 667-676 [0385]ÓÓ
•ÓZOUÓetÓal.Ó*Plant Cell.*, 1997, vol. 9, 909-23 [0385]

REIVINDICAÇÕESÓ

1. Lípido vegetal extraído, que compreende ácidos gordos numa forma esterificada, os ácidos gordos compreendendo ácido oleico, ácido palmítico, ácidos gordos ω6 que compreendem ácido linoleico (LAÉ, ácidos gordos ω3 que compreendem um ácido α-linolénico (ALAÉ e ácido docosahexaenoico (DHAÉ e, opcionalmente, um ou mais de ácido estearidónico (SDAÉ, ácido eicosapentaenoico (EPAÉ, ácido docosapentaenoico (DPAÉ e ácido eicosatetraenoico (ETAÉ, em que o nível de DHA no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é de 7 % a 20 %, e em que o nível de ácido palmítico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído está entre 2 % e 16 %, e em que o nível de ácido mirístico (C14:0É no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é inferior a 1 %.

2. O lípido de acordo com a reivindicação 1, que tem uma ou mais ou todas as seguintes características

i. o nível de ácido palmítico no teor de ácido gordo total do lípido extraído está entre 2 % e 15 %,

ii. o nível de ácido oleico no teor de ácido gordo total do lípido extraído está entre 3 % e 30 %,

iii. o nível de ácido linoleico (LAÉ no teor de ácido gordo total do lípido extraído está entre 4 % e 35 %,

iv. o nível de ácido α-linolénico (ALAÉ no teor de ácido gordo total do lípido extraído está entre 7 % e 40

v. o nível de ácido γ-linolénico (GLAÉ no teor de ácido gordo total do lípido extraído é inferior a 4 %

vi. o nível de ácido estearidónico (SDAÉ no teor de ácido gordo total do lípido extraído é inferior a 4 %,

vii. o nível de ácido eicosatetraenoico (ETAÉ no teor de ácido gordo total do lípido extraído é inferior a 4 %,

viii. o nível de ácido eicosatrienoico (ETrAÉ no teor de ácido gordo total do lípido extraído é inferior a 4 %,

ix. o nível de ácido eicosapentaenoico (EPAÉ no teor de ácido gordo total do lípido extraído é inferior a 4 %,
x. o nível de ácido docosapentaenoico (DPAÉ no teor de ácido gordo total do lípido extraído é inferior a 4 %,
xi. o nível de DHA no teor de ácido gordo total do lípido extraído está entre 11 % e 20 %,
xii. o nível de ácidos gordos saturados totais no teor de ácido gordo total do lípido extraído está entre 4 % e 25 %,
xiii. o nível de ácidos gordos monoinsaturados totais no teor de ácido gordo total do lípido extraído está entre 4 % e 35 %,
xiv. o nível de ácidos gordos polinsaturados totais no teor de ácido gordo total do lípido extraído está entre 20 % e 75 %,
xv. o nível de ácidos gordos ω6 totais no teor de ácido gordo total do lípido extraído é inferior a 20 %,
xvi. o nível de ácidos gordos ω6 novos no teor de ácido gordo total do lípido extraído é inferior a 10 %,
xvii. o nível de ácidos gordos ω3 totais no teor de ácido gordo total do lípido extraído está entre 40 % e 60 %,
xviii. o nível de ácidos gordos ω3 novos no teor de ácido gordo total do lípido extraído está entre 9 % e 33 %,
xix. a razão de ácidos gordos ω6 totais: ácidos gordos ω3 totais no teor de ácido gordo do lípido extraído está entre 1,0 e 3,0,
xx. a razão de ácidos gordos ω6 novos: ácidos gordos ω3 novos no teor de ácidos gordos do lípido extraído está entre 1,0 e 3,0,
xxi. a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se numa eficiência de conversão de ácido oleico em DHA de pelo menos 10 %,
xxii. a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se numa eficiência de conversão de LA em DHA de pelo menos 15 %,

xxiii. a composição de ácidos gordos do lípido baseia-se numa eficiência de conversão de ALA em DHA de pelo menos 17 %,
xxiv. o ácido gordo total no lípido extraído tem menos de 1 % de C20:1,
xxv. o teor de triacilglicerol (TAGÉ do lípido é pelo menos 70 %,
xxvi. o lípido compreende diacilglicerol (DAGÉ,
xxvii. o lípido compreende menos de 10 % de ácidos gordos livres (não esterificadosÉ e/ou fosfolípidos, ou menos de 0,5 % de ácidos gordos livres (não esterificadosÉ e/ou fosfolípidos,
xxviii. pelo menos 70 % do DHA esterificado sob a forma de TAG está na posição sn-1 ou sn-3 do TAG,
xxix. o lípido compreende tri-DHA TAG (TAG 66:18É.

3. O lípido de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2 que compreende adicionalmente um ou mais esteróis, e/ou que está sob a forma de um óleo, e que compreende menos de 10 mg de esteróis/g de óleo, menos de 7 mg e esteróis/g de óleo, entre 1,5 mg e 10 mg de esteróis/g de óleo, ou entre 1,5 mg e 7 mg de esteróis/g de óleo.

4. O lípido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o lípido é óleo de *Brassica* sp. ou óleo de *Camelina sativa*.

5. Um processo para a produção de lípido vegetal extraído, compreendendo as etapas de
iÉ obter uma parte de planta compreendendo lípido, o lípido compreendendo ácidos gordos sob uma forma esterificada, os ácidos gordos que compreendem ácido oleico, ácido palmítico, ácidos gordos ω6 que compreendem o ácido linoleico (LAÉ e ácido γ-linolénico (GLAÉ, ácidos gordos ω3 que compreendem ácido α-linolénico (ALAÉ, ácido

estearidónico (SDAÉ, ácido docosapentaenoico (DPAÉ e ácido docosahexaenoico (DHAÉ e, opcionalmente, um ou mais de ácido eicosapentaenoico (EPAÉ e ácido eicosatetraenoico (ETAÉ, em que o nível de DHA no teor de ácidos gordos totais de lípido extraível na parte da planta é de 7 % a 20 %, e em que o nível de ácido palmítico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído está entre 2 % e 16 %, e em que o nível de ácido mirístico (C14:0É no teor total de ácido gordo do lípido extraível é inferior a 1 %, e

iiÉ extrair lípidos a partir da parte da planta,

em que o nível de DHA no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é de 7 % a 20 %, e em que o nível de ácido palmítico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído está entre 2 % e 16 %, e em que o nível de ácido mirístico (C14:0É no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é inferior a 1 %.

6. O processo de acordo com a reivindicação 5, em que o lípido extraído tem uma ou mais das características definidas nas reivindicações 2 a 4.

7. O processo de acordo com a reivindicação 5 ou reivindicação 6, em que a parte de planta compreende polinucleótidos exógenos que codificam uma Δ12-dessaturase, uma ω3-dessaturase ou uma Δ15-dessaturase, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ6-elongase e uma Δ5-elongase, e em que cada polinucleótido está operativamente ligado a um ou mais promotores que são capazes de direcionar a expressão dos ditos polinucleótidos numa célula da parte da planta.

8. O processo de acordo com a reivindicação 7, em que a parte da planta tem uma ou mais, ou todas das seguintes características

iÉ a Δ12-desaturase converte o ácido oleico a ácido linoleico numa ou mais células da planta com uma eficiência de pelo menos 60%,
iiÉ a ω3-desaturase converte ácidos gordos ω6 em ácidos gordos ω3 numa ou mais células da planta com uma eficiência de pelo menos 65 %,
iiiÉ a Δ6-desaturase converte ALA em SDA numa ou mais células da planta com uma eficiência de pelo menos 30 %,
ivÉ a Δ6-desaturase converte o ácido linoleico em ácido γ-linolénico numa ou mais células da planta com uma eficiência inferior a 5 %,
vÉ a Δ6-elongase converte SDA em ETA numa ou mais células da planta com uma eficiência de pelo menos 60 %,
viÉ a Δ5-desaturase converte ETA em EPA numa ou mais células da planta com uma eficiência de pelo menos 60 %,
viiÉ a Δ5-elongase converte EPA a DPA numa ou mais células da planta com uma eficiência de pelo menos 80 %,
viiiÉ a Δ4-desaturase converte DPA em DHA numa ou mais células da planta com uma eficiência de pelo menos 80 %,
ixÉ a eficiência da conversão de ácido oleico em DHA numa ou mais células da parte da planta é pelo menos 10 %,
xÉ a eficiência de conversão de LA em DHA numa ou mais células da parte da planta é pelo menos 15%,
xiÉ a eficiência da conversão de ALA em DHA numa ou mais células da parte da planta é pelo menos 17 %,
xiiÉ uma ou mais células da parte da planta compreendem pelo menos 15 % mais ácidos gordos ω3 do que as células correspondentes desprovidas dos polinucleótidos exógenos,
xiiiÉ a Δ6-desaturase preferentemente dessatura ácido α-linolénico (ALAÉ em relação ao ácido linoleico (LAÉ,
xivÉ a Δ6-elongase também tem atividade Δ9-elongase,
xvÉ a Δ12-desaturase também tem atividade Δ15-desaturase,
xviÉ a Δ6-desaturase também tem atividade Δ8-desaturase,
xviiÉ a ω3-desaturase também tem atividade Δ15-desaturase em LA,

xviiiÉ a ω3-desaturase dessatura ambos LA e/ou GLA,
xixÉ a ω3-desaturase preferentemente dessatura GLA em relação à LA,
xxÉ o nível de DHA na parte da planta baseia-se numa eficiência de conversão de ácido oleico em DHA na parte de planta de pelo menos 10 %,
xxiÉ o nível de DHA na parte da planta baseia-se numa eficiência de conversão de LA em DHA na parte de planta de pelo menos 15 %,
xxiiÉ o nível de DHA na parte da planta baseia-se numa eficiência de conversão de ALA em DHA na parte de planta de pelo menos 17 %,
xxiiiÉ uma ou mais ou todas as desaturases têm maior atividade num substrato de acil-CoA do que num substrato de acil-PC correspondente,
xxivÉ a Δ6-desaturase tem maior atividade Δ6-desaturase em ALA do que em LA como substrato de ácidos gordos,
xxvÉ a Δ6-dessaturase tem uma maior atividade Δ6-dessaturase em ALA-CoA como substrato de ácidos gordos do que em ALA unida na posição *sn*-2 de PC como substrato de ácidos gordos,
xxviÉ a Δ6-dessaturase tem pelo menos 2 vezes maior atividade Δ6-dessaturase em ALA como um substrato em comparação com LA,
xxviiÉ a Δ6-dessaturase tem maior atividade em ALA-CoA como substrato de ácidos gordos do que em ALA unido na posição *sn*-2 de PC como substrato de ácidos gordos,
xxviiiÉ a Δ6-dessaturase tem pelo menos 5 vezes maior atividade Δ6-dessaturase em ALA-CoA como substrato de ácidos gordos do que em ALA unido na posição *sn*-2 de PC como substratos de ácidos gordos,
xxixÉ a dessaturase é uma dessaturase *front-end*,
xxxÉ a Δ6-dessaturase não tem atividade Δ5-dessaturase detetável em ETA.

9. O processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, em que se aplicam uma ou mais das seguintes características:

iÉ os polinucleótidos exógenos estão covalentemente ligados numa molécula de ADN, preferentemente uma molécula de T-ADN, integrada no genoma de células da parte da planta preferentemente onde o número de tais moléculas de ADN integradas no genoma das células da parte da planta não é mais do que um, dois ou três, ou é dois ou três,

iiÉ o teor de óleo total da parte da planta que compreende os polinucleótidos exógenos é pelo menos 40 % do teor de óleo total de uma parte da planta correspondente desprovida dos polinucleótidos exógenos,

iiiÉ o lípido está sob a forma de um óleo, preferentemente um óleo de semente de uma semente de oleaginosa, e em que pelo menos 90 % em peso do lípido é triacilgliceróis,

ivÉ o processo compreende adicionalmente tratar o lípido para aumentar o nível de DHA como uma percentagem do teor de ácidos gordos total, preferentemente o tratamento é a transesterificação.

10. Uma célula hospedeira que compreende polinucleótidos exógenos que codificam um dos seguintes conjuntos de enzimas:

iÉ uma Δ12-dessaturase, uma ω3-dessaturase ou uma Δ15-dessaturase, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ6-elongase e uma Δ5-elongase,

iiÉ uma ω3-dessaturase, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ6-elongase e uma Δ5-elongase,

iiiÉ uma Δ15-dessaturase, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ6-elongase e uma Δ5-elongase,

ivÉ uma Δ12-dessaturase, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ6-elongase e uma Δ5-elongase,

vÉ uma ω3-dessaturase, uma Δ8-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ9-elongase e uma Δ5-elongase,

viÉ uma Δ15-dessaturase, uma Δ8-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ9-elongase e uma Δ5-elongase,

viiÉ uma Δ12-dessaturase, uma Δ8-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ9-elongase e uma Δ5-elongase, ou

viiiÉ uma Δ12-dessaturase, uma ω3-dessaturase ou uma Δ15-dessaturase, uma Δ8-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, Δ4-dessaturase, uma Δ9-elongase e uma Δ5-elongase,

em que cada polinucleótido está operativamente ligado a um ou mais promotores que são capazes de direcionar a expressão dos ditos polinucleótidos na célula, e em que a célula compreende um lípido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

11. Uma planta transgénica que compreende uma célula de acordo com a reivindicação 10.

12. Uma planta oleaginosa que compreende

aÉ lípido na sua semente, o lípido compreendendo ácidos gordos numa forma esterificada, e

bÉ polinucleótidos exógenos que codificam um dos seguintes conjuntos de enzimas:

iÉ uma Δ12-dessaturase, uma ω3-dessaturase de fungos e/ou Δ15-dessaturase de fungos, uma Δ6-dessaturase, uma Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ6-elongase e uma Δ5-elongase, ou

iiÉ uma Δ12-dessaturase, uma ω3-dessaturase de fungos e/ou Δ15-dessaturase de fungos, uma Δ8-dessaturase, uma

Δ5-dessaturase, uma Δ4-dessaturase, uma Δ9-elongase e uma Δ5-elongase,

em que cada polinucleótido está operativamente ligado a um ou mais promotores específicos de sementes que são capazes de direcionar a expressão dos ditos polinucleótidos em sementes em desenvolvimento da planta, em que os ácidos gordos compreendem ácido oleico, ácido palmítico, ácidos gordos ω6 que compreendem o ácido linoleico (LAÉ e ácido γ-linolénico (GLAÉ, ácidos gordos ω3 que compreendem ácido α-linolénico (ALAÉ, ácido estearidónico (SDAÉ, ácido docosapentaenoico (DPAÉ e docosahexaenoico (DHAÉ, e opcionalmente ácido eicosapentaenoico (EPAÉ e/ou ácido eicosatetraenoico (ETAÉ, e em que o nível de DHA no teor de ácidos gordos total do lípido é de 7 % a 20 %, e em que o nível de ácido palmítico no teor de ácidos gordos total do lípido está entre 2 % e 16 %, e em que o nível de ácido mirístico (C14:0É no teor de ácidos gordos total do lípido é inferior a 1 %.

13. A planta de acordo com a reivindicação 12, em que se aplicam uma ou mais das seguintes características:

iÉ a planta é uma planta de canola, *Glycine max*, *Camelina sativa* ou *Arabidopsis thaliana*,

iiÉ uma ou mais das dessaturases é capaz de utilizar um substrato de acil-CoA,

iiiÉ a semente colhida, madura da planta tem um teor de DHA de pelo menos 28 mg por grama de semente.

14. Uma parte de planta que tem uma ou mais das seguintes características

iÉ compreende um lípido de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4,

iiÉ é de uma planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, ou

iiiÉ pode ser utilizado num processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 9.

15. A parte da planta de acordo com a reivindicação 14 que é uma semente.

16. Um método de produção de sementes, compreendendo o método,

aÉ crescimento de uma planta que produz uma parte de acordo com a reivindicação 14 ou reivindicação 15, ou uma planta de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13,

bÉ colheita de sementes da planta ou das plantas, e

cÉ opcionalmente, extração de lípido da semente, preferentemente para produzir óleo com um rendimento total de DHA de pelo menos 60 kg DHA/hectare.

17. Farinha de sementes obtida a partir da semente de acordo com a reivindicação 15.

18. Um método para produzir um produto alimentar para consumo humano ou animal, compreendendo o método misturar um ou mais do lípido ou óleo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, da célula de acordo com a reivindicação 10, da planta transgénica de acordo com a reivindicação 11, da planta oleaginosa de acordo com a reivindicação 12 ou reivindicação 13, da parte de planta de acordo com a reivindicação 14 ou reivindicação 15, ou da farinha de semente de acordo com a reivindicação 17, com pelo menos um outro ingrediente alimentar.

19. Um ou mais dos lípidos ou óleo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, a célula de acordo com a reivindicação 10, a planta transgénica de acordo com a reivindicação 11, a planta oleaginosa de acordo com a

reivindicação 12 ou reivindicação 13, a parte de planta de acordo com a reivindicação 14 ou reivindicação 15 ou a farinha de semente de acordo com a reivindicação 17 para utilização no tratamento ou prevenção de uma condição médica que se beneficiaria de um PUFA, em que a condição é arritmia cardíaca, angioplastia, inflamação, asma, psoríase, osteoporose, pedras nos rins, SIDA, esclerose múltipla, artrite reumatoide, doença de Crohn, esquizofrenia, cancro, síndrome alcoólica fetal, transtorno de hiperatividade e défice de atenção, fibrose cística, fenilcetonúria, depressão unipolar, hostilidade agressiva, adrenoleucodistrofia, doença cardíaca coronária, hipertensão, diabetes, obesidade, doença de Alzheimer, doença pulmonar obstrutiva crónica, colite ulcerativa, restenose após angioplastia, eczema, pressão arterial elevada, agregação plaquetária, hemorragia gastrointestinal, endometriose, síndrome pré-menstrual, encefalomielite miálgica, fadiga crónica após infeções virais ou uma doença ocular.

20. Um processo para a produção de ésteres etílicos de ácidos gordos polinsaturados, compreendendo o processo a transesterificação de triacilgliceróis num lípido vegetal extraído, em que o lípido vegetal extraído compreende ácidos gordos esterificados sob a forma de triacilgliceróis, os ácidos gordos compreendendo ácido oleico, ácido palmítico, ácidos gordos ω6 que compreendem ácido linoleico (LAÉ, os ácidos gordos ω3 que compreendem um ácido linolénico (ALAÉ e ácido docosahexaenoico (DHAÉ, e opcionalmente um ou mais de ácido estearidónico (SDAÉ, ácido eicosapentaenoico (EPAÉ, ácido docosapentaenoico (DPAÉ e ácido eicosatetraenoico (ETAÉ, em que o nível de DHA no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é de 7 % a 20 %, e em que o nível de ácido palmítico no teor de ácidos gordos total do lípido extraído está entre 2 % e

16 %, e em que o nível de ácido mirístico (C14:0É no teor de ácidos gordos total do lípido extraído é inferior a 1 %, produzindo assim os ésteres etílicos.

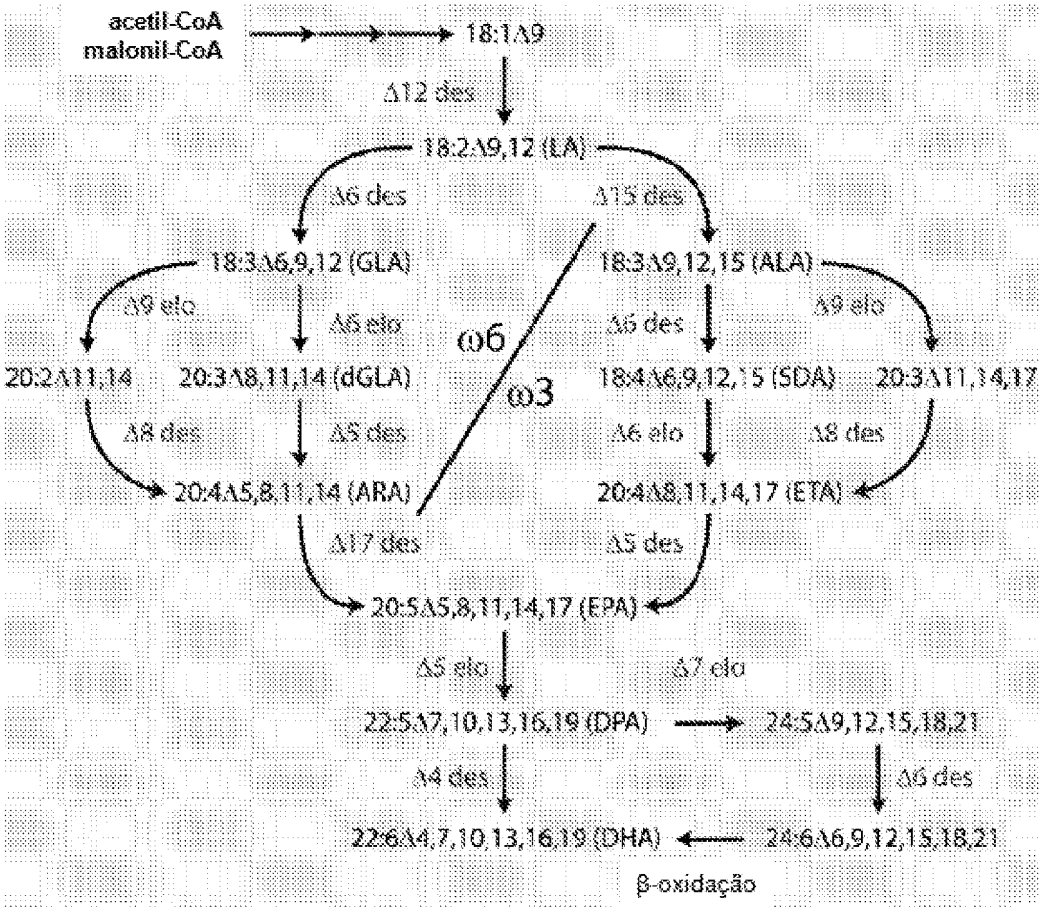

acetil-CoA
malonil-CoA
18:1Δ9
Δ12 des
18:2Δ9,12 (LA)
Δ6 des
Δ15 des
18:3Δ6,9,12 (GLA)
18:3Δ9,12,15 (ALA)
Δ9 elo
Δ6 elo
Δ6 des
Δ9 elo
ω6
ω3
20:2Δ11,14
20:3Δ8,11,14 (dGLA)
18:4Δ6,9,12,15 (SDA)
20:3Δ11,14,17
Δ8 des
Δ5 des
Δ6 elo
Δ8 des
20:4Δ5,8,11,14 (ARA)
20:4Δ8,11,14,17 (ETA)
Δ17 des
Δ5 des
20:5Δ5,8,11,14,17 (EPA)
Δ5 elo
Δ7 elo
22:5Δ7,10,13,16,19 (DPA)
24:5Δ9,12,15,18,21
Δ4 des
Δ6 des
22:6Δ4,7,10,13,16,19 (DHA)
24:6Δ6,9,12,15,18,21
β-oxidação

Figura 1

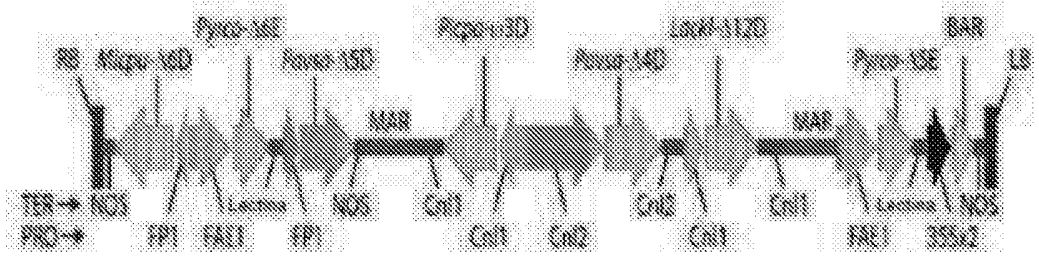

RB
Pyco-16E
Pcpa-3D
Dkk4-112D
BAR
LB
Pcpa-16D
Rcruz-15D
Rcruz-14D
Pyco-12E
MAR
MAR
TER→
PID→
NOS
Lectina
NOS
Cel1
Cel2
Cel1
Cel2
Cel1
Lectina
NOS
FP1
FAS1
FP1
RE1
35S2

Figura 2

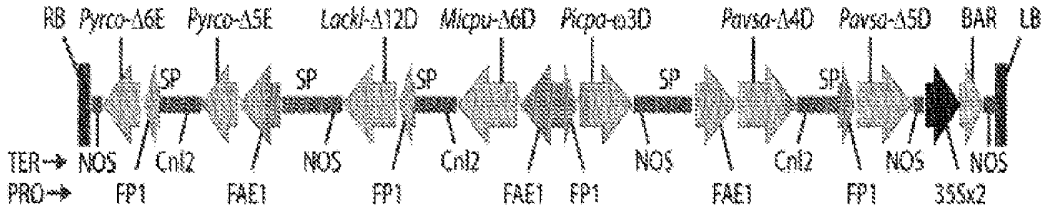

RB
Pyrco-Δ6E
Pyrco-Δ5E
Lackl-Δ12D
Micpu-Δ6D
Picpa-ω3D
Parsa-Δ4D
Parsa-Δ5D
BAR
LB
SP
TER→
PRO→
NOS
Cnl2
FP1
FAE1
NOS
FP1
Cnl2
FAE1
FP1
NOS
FAE1
Cnl2
FP1
NOS
NOS
35Sx2

Figura 3

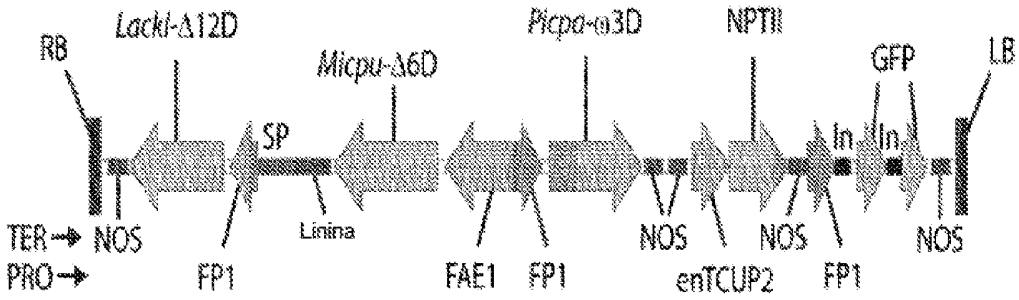

RB
Lackl-Δ12D
Micpu-Δ6D
Picpa-ω3D
NPTII
GFP
LB
SP
In
In
TER→
PRO→
NOS
FP1
Linina
FAE1
FP1
NOS
enTCUP2
NOS
FP1
NOS

Figura 4

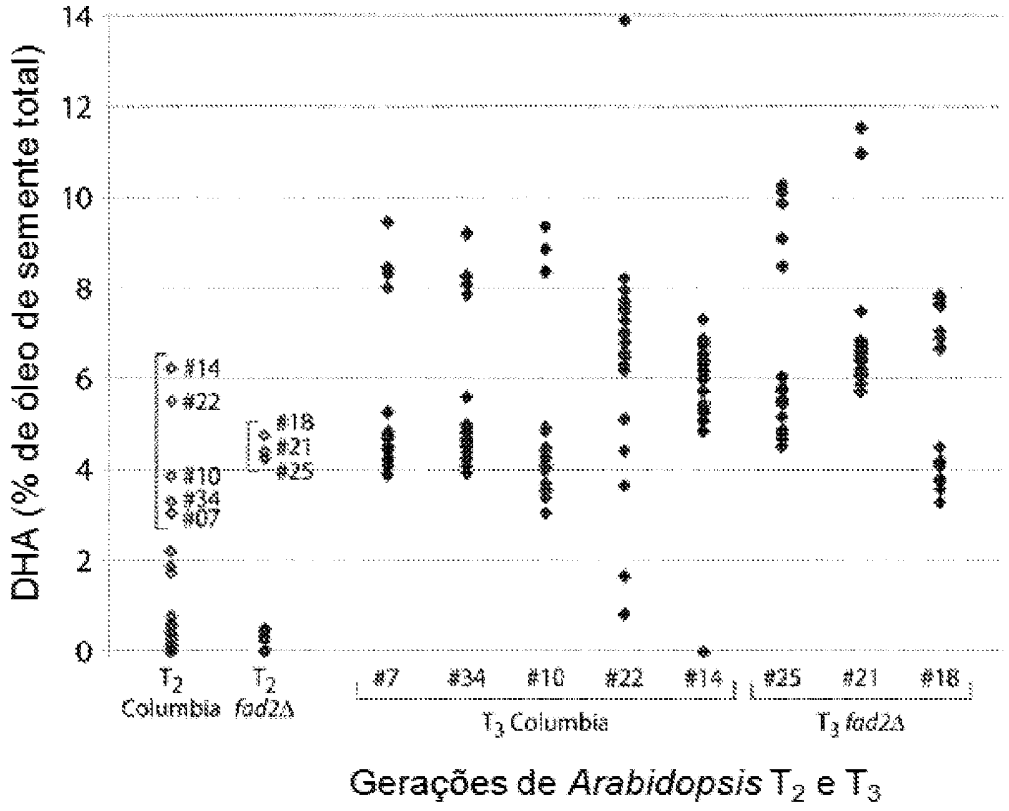

DHA (% de óleo de semente total)
14
12
10
8
6
4
2
0
#14
#22
#10
#34
#07
#18
#21
#25
T2 Columbia
T2 fad2Δ
#7
#34
#10
#22
#14
#25
#21
#18
T3 Columbia
T3 fad2Δ
Gerações de Arabidopsis T2 e T3

Figura 5

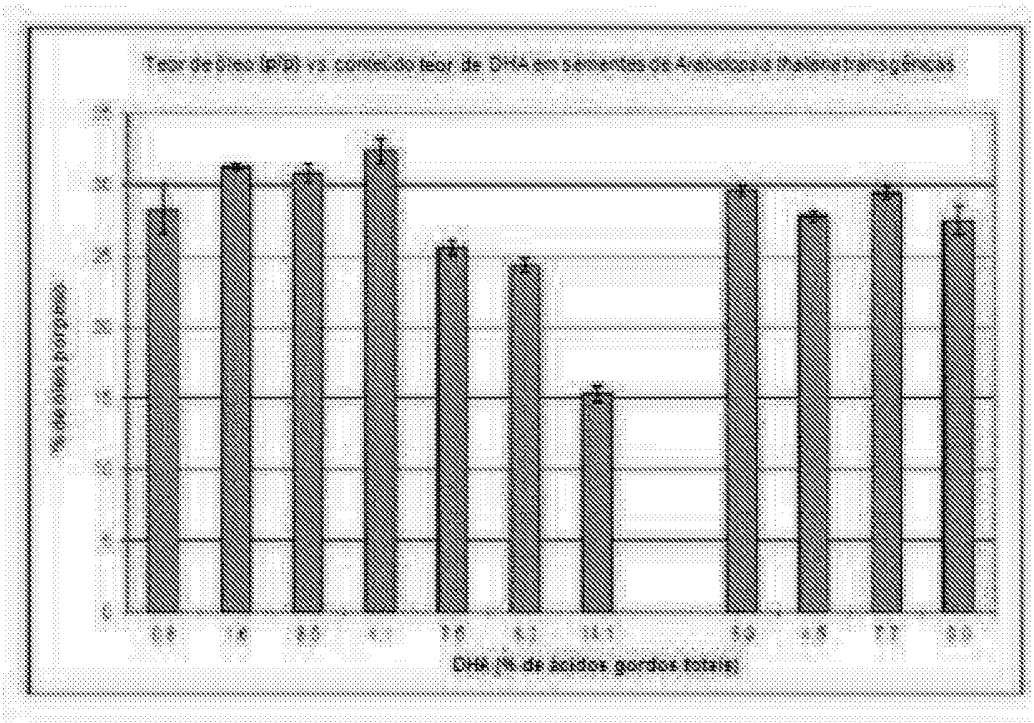


Figura 6

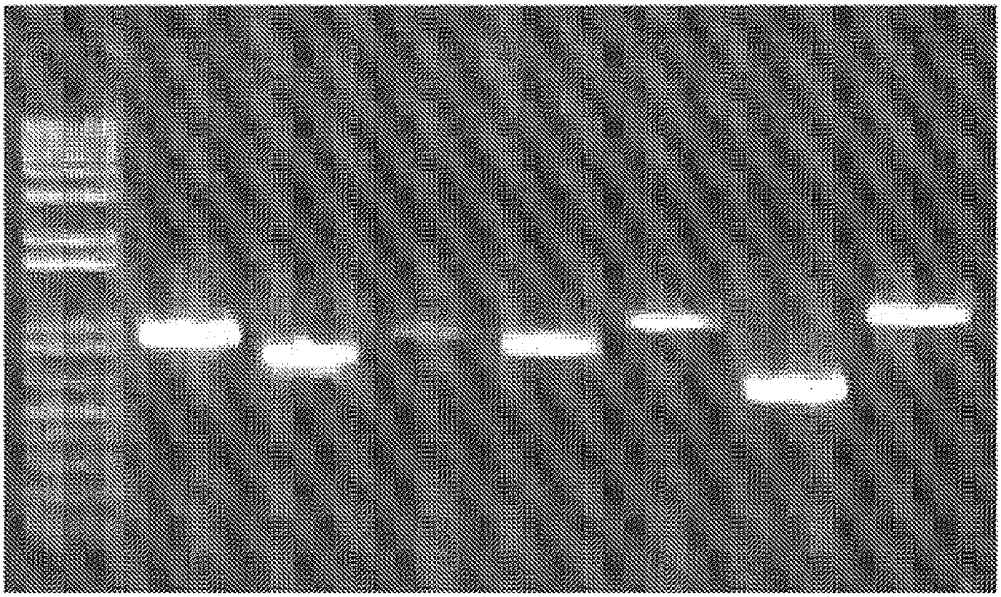


Figura 7

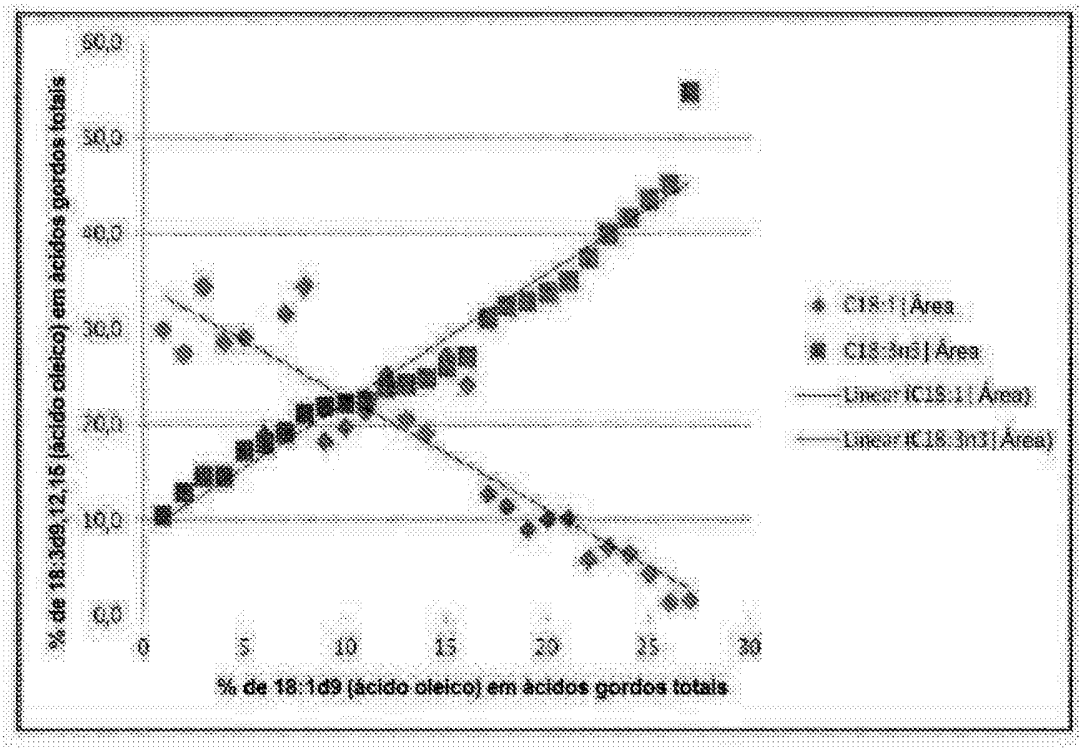

% de 18:3d9,12,15 (ácido oleico) em ácidos gordos totais
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
0
5
10
15
20
25
30
% de 18:1d9 (ácido oleico) em ácidos gordos totais
C18:1 | Área
C18:3n3 | Área
Linear (C18:1 | Área)
Linear (C18:3n3 | Área)

Figura 8

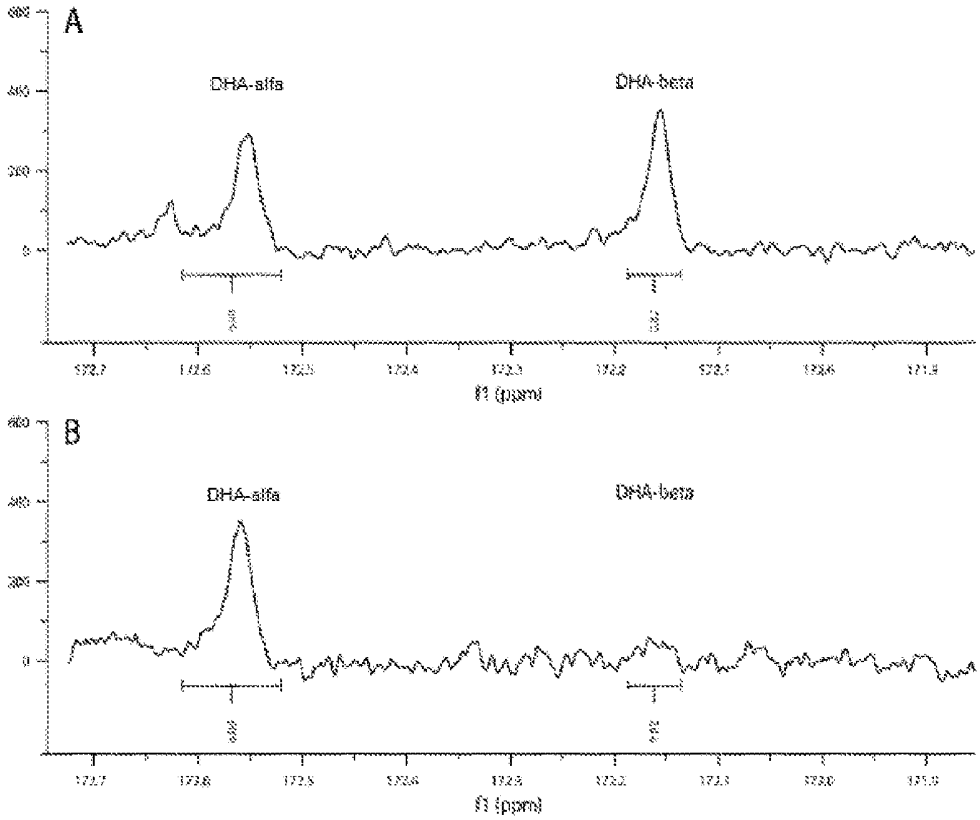


Figura 9

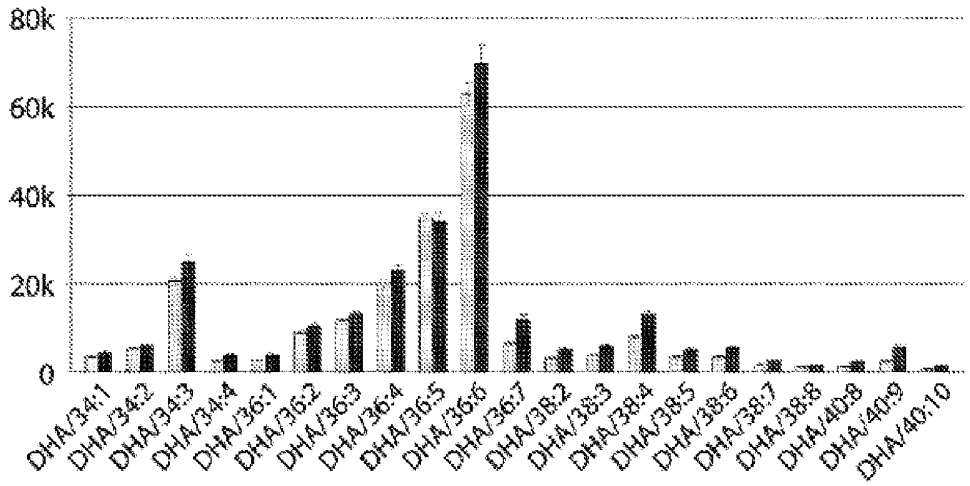

80k
60k
40k
20k
0
DHA/34:1
DHA/34:2
DHA/34:3
DHA/34:4
DHA/36:1
DHA/36:2
DHA/36:3
DHA/36:4
DHA/36:5
DHA/36:6
DHA/36:7
DHA/38:2
DHA/38:3
DHA/38:4
DHA/38:5
DHA/38:6
DHA/38:7
DHA/38:8
DHA/40:8
DHA/40:9
DHA/40:10

Figura 10

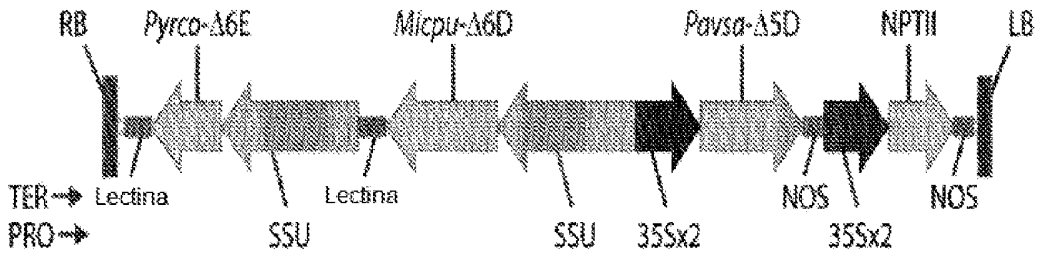

RB
Pyrco-Δ6E
Micpu-Δ6D
Pavsa-Δ5D
NPTII
LB
TER
PRO
Lectina
SSU
Lectina
SSU
35Sx2
NOS
35Sx2
NOS

Figura 11

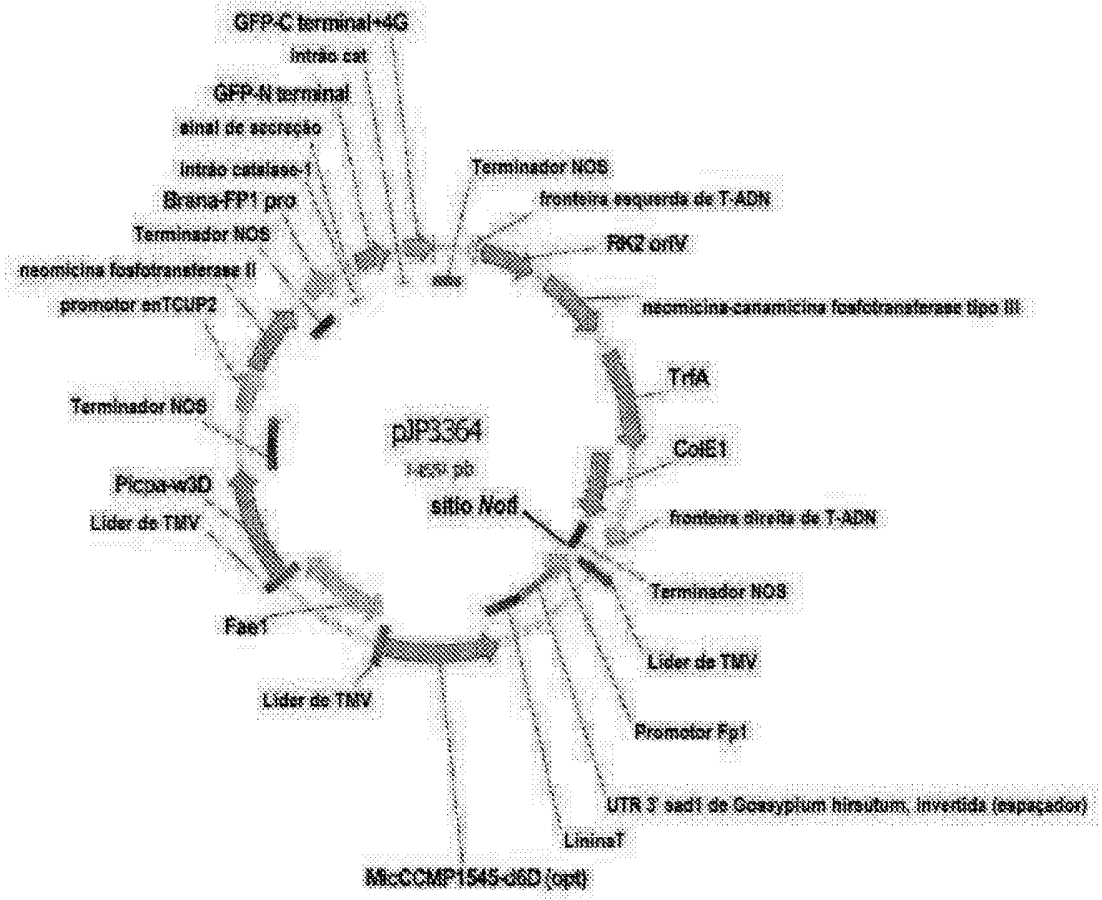

GFP-C terminal+4G
intrão cat
GFP-N terminal
sinal de secreção
intrão catalase-1
Brana-FP1 pro
Terminador NOS
neomicina fosfotransferase II
promotor enTCUP2
Terminador NOS
PicoJa-w3D
Líder de TMV
Fae1
Líder de TMV
LininaT
Mic:CCMP1545-d6D (opt)
UTR 3' sad1 de Gossypium hirsutum, invertida (espaçador)
Promotor Fp1
Líder de TMV
Terminador NOS
fronteira direita de T-ADN
ColE1
TrfA
neomicina-canamicina fosfotransferase tipo III
RK2 oriV
fronteira esquerda de T-ADN
Terminador NOS
attb
pJP3364
sítio NotI

Figura 12

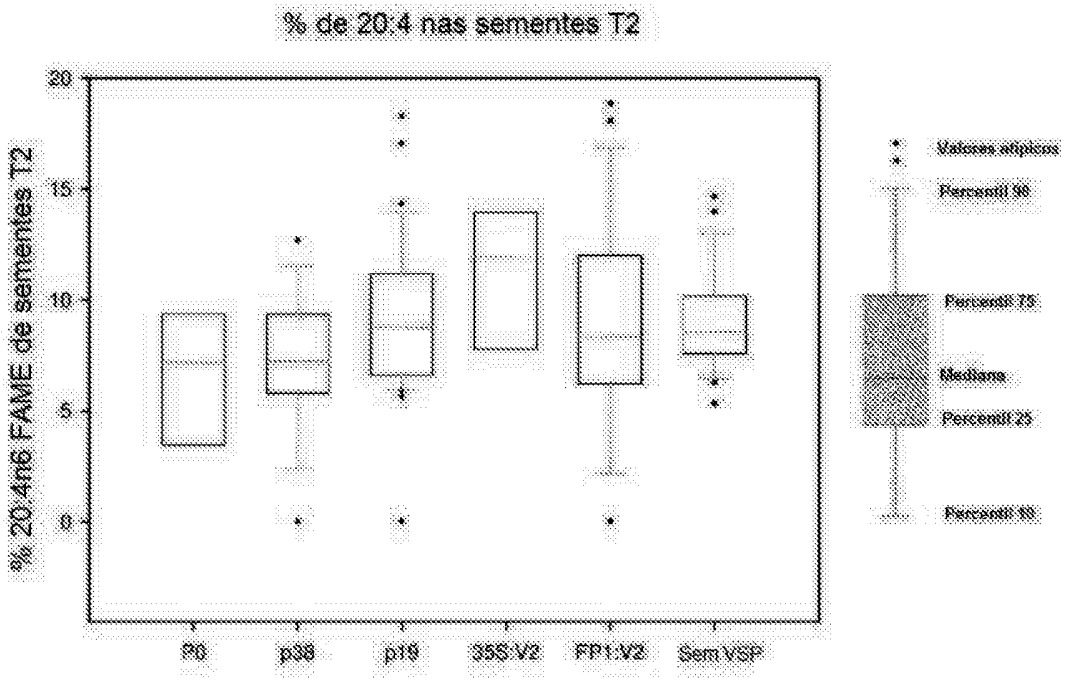

% de 20:4 nas sementes T2
% 20:4n6 FAME de sementes T2
20
15
10
5
0
p0
p38
p19
35S:V2
FP1:V2
Sem VSP
Valores atípicos
Percentil 90
Percentil 75
Mediana
Percentil 25
Percentil 10

Figura 13

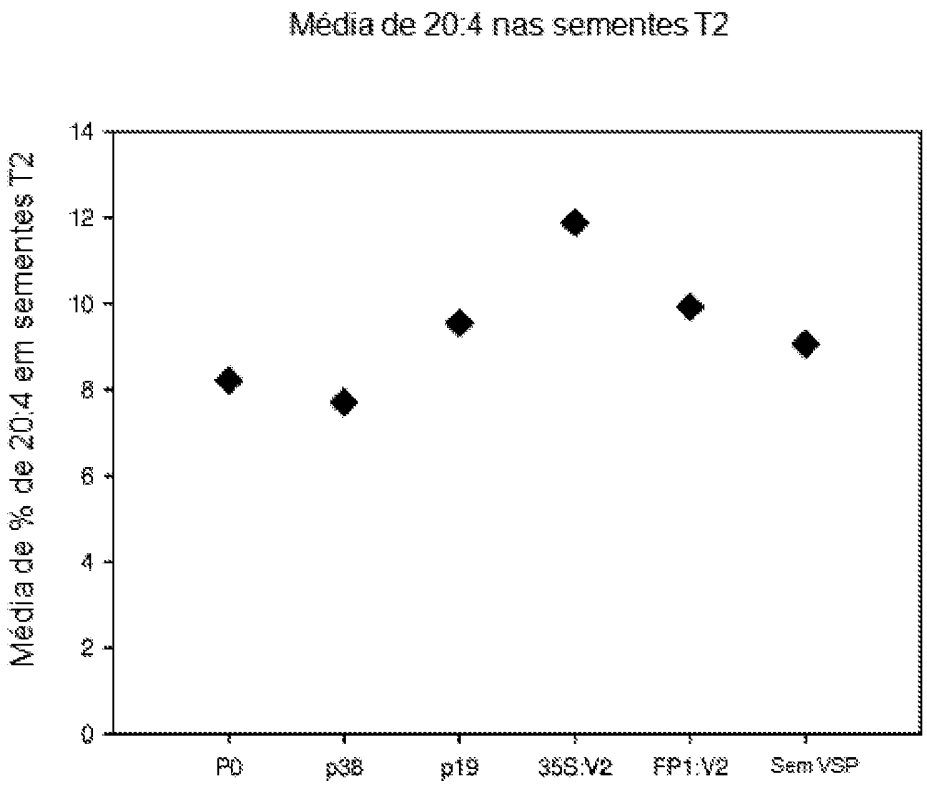

Média de 20:4 nas sementes T2
Média de % de 20:4 em sementes T2
0
2
4
6
8
10
12
14
P0
p38
p19
35S:V2
FP1:V2
Sem VSP

Figura 14

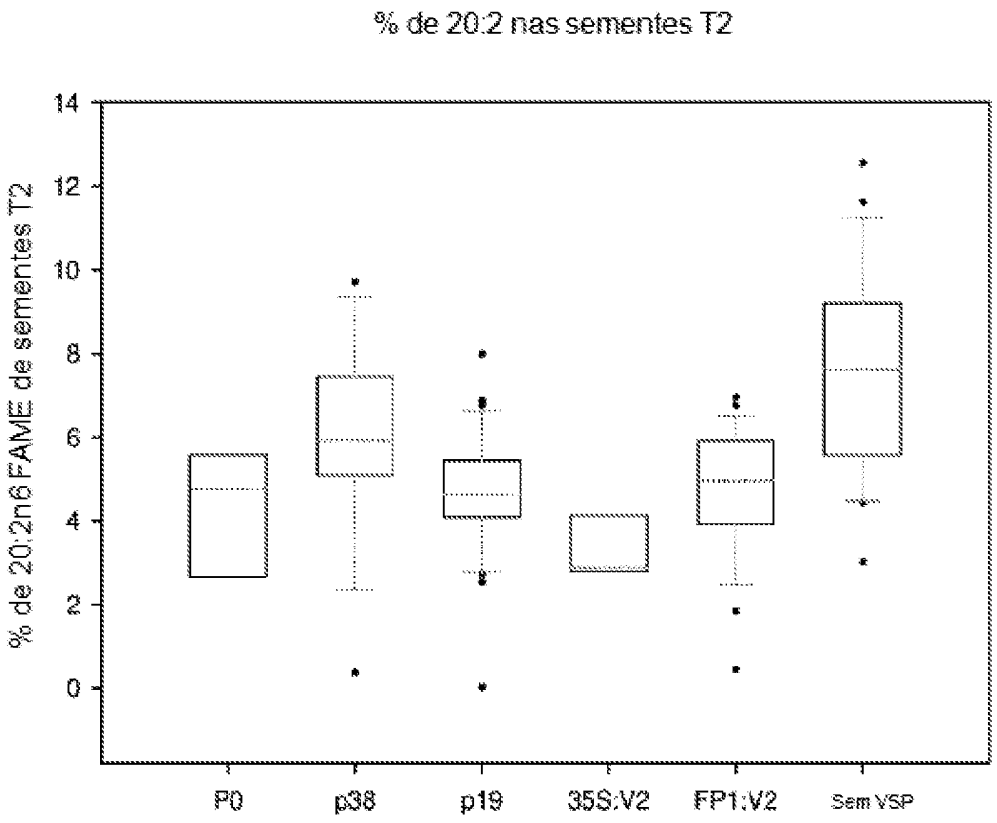

% de 20:2 nas sementes T2
% de 20:2n6 FAME de sementes T2
14
12
10
8
6
4
2
0
P0
p38
p19
35S:V2
FP1:V2
Sem VSP

Figura 15

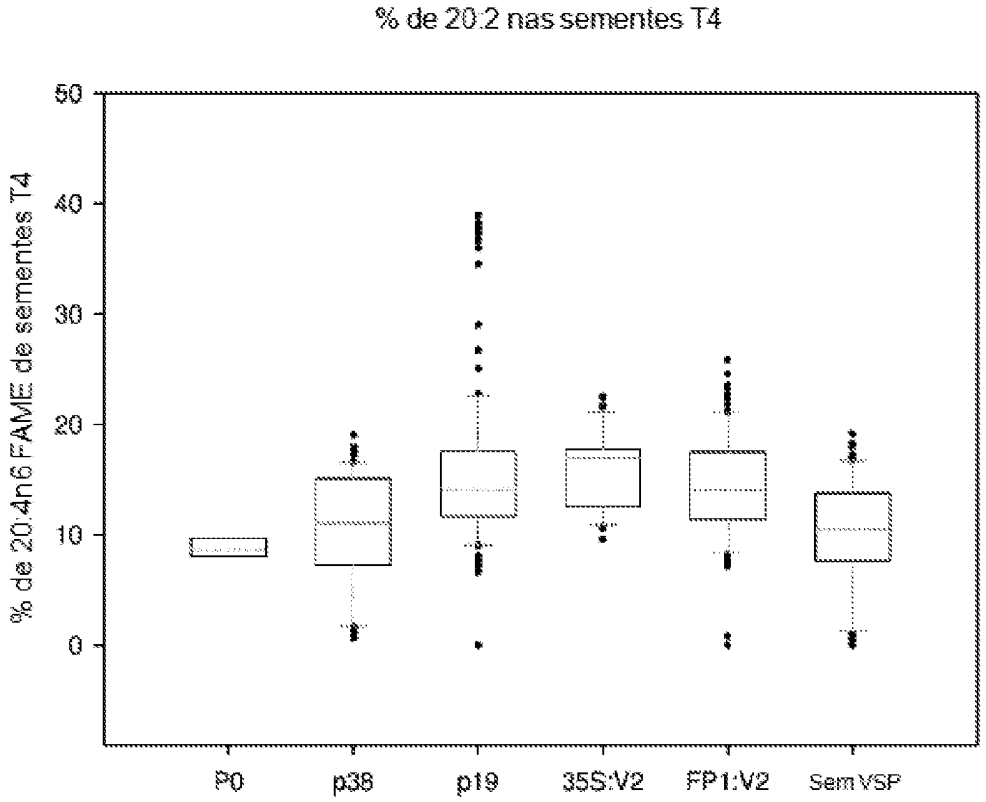

% de 20:2 nas sementes T4
% de 20:4n6 FAME de sementes T4
50
40
30
20
10
0
P0
p38
p19
35S:V2
FP1:V2
Sem VSP

Figura 16

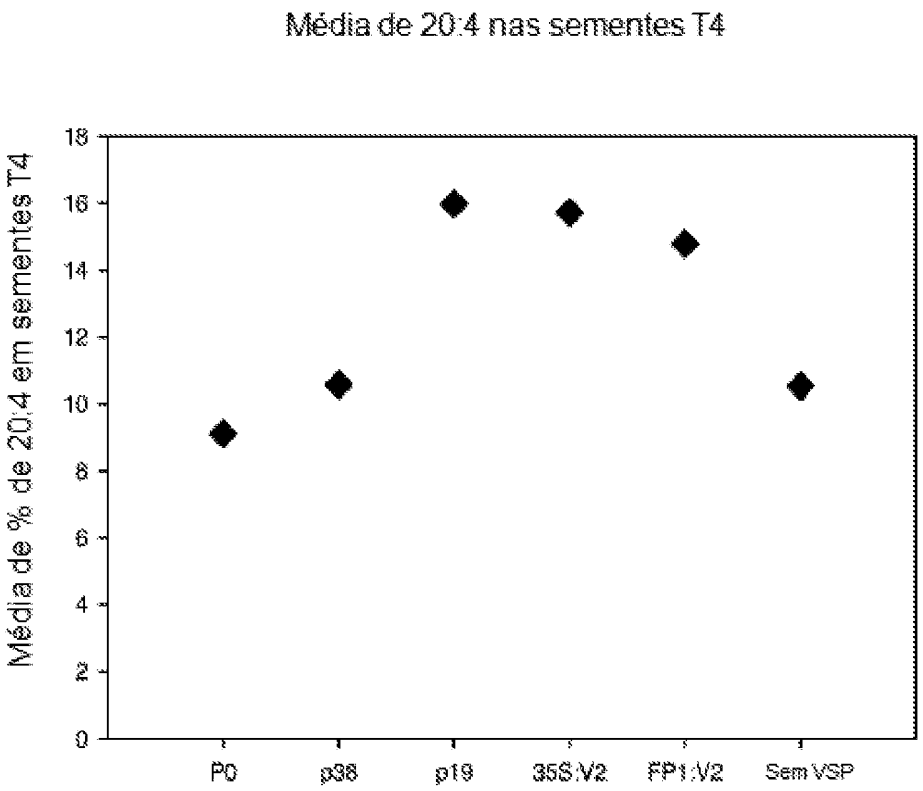

Média de 20:4 nas sementes T4
Média de % de 20:4 em sementes T4
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
P0
p38
p19
35S:V2
FP1:V2
Sem VSP

Figura 17

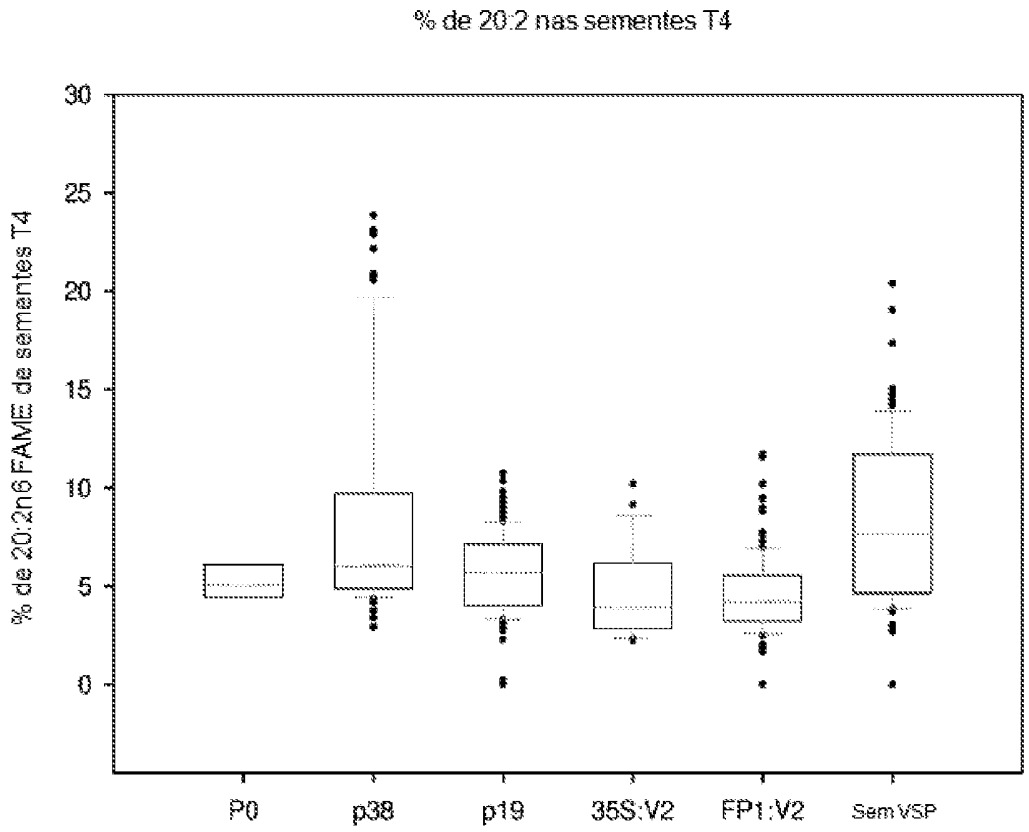
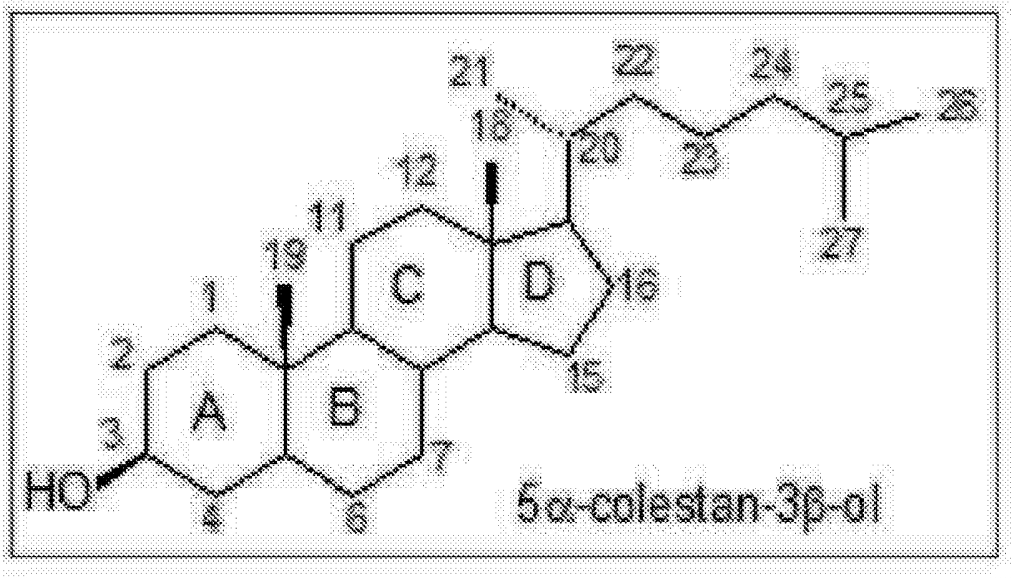

% de 20:2 nas sementes T4
% de 20:2n6 FAME de sementes T4
30
25
20
15
10
5
0
P0
p38
p19
35S:V2
FP1:V2
SemVSP

Figura 18

A)


21
22
24
25
26
18
20
23
12
11
27
19
C
D
16
1
2
A
B
15
3
7
HO
4
6
5α-colestan-3β-ol

B)

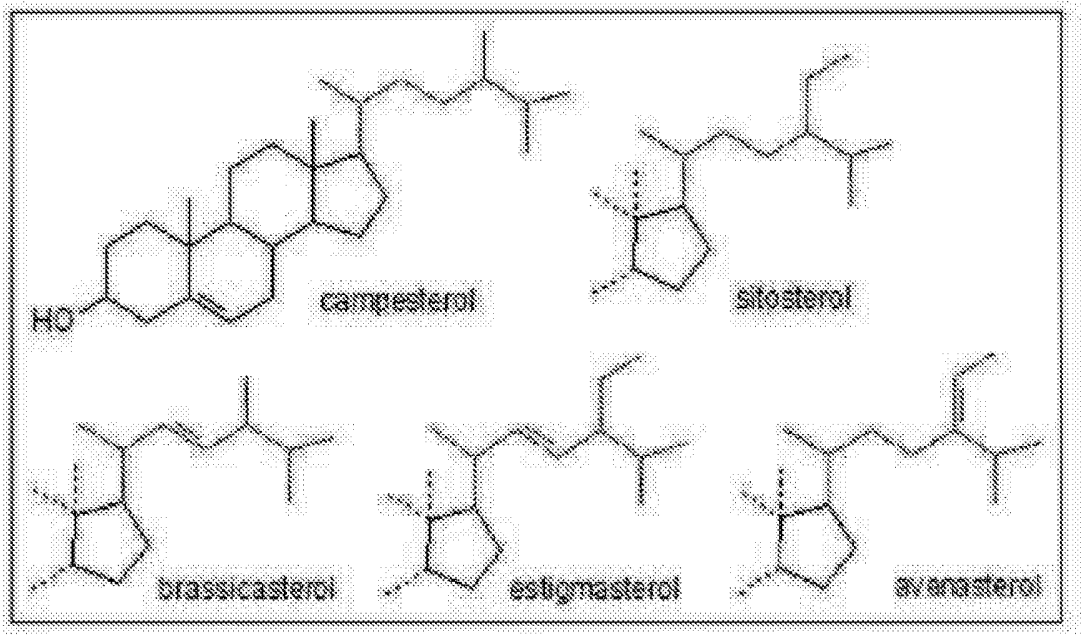

HO
campesterol
sitosterol
brassicasterol
estigmasterol
avenasterol

Figura 19

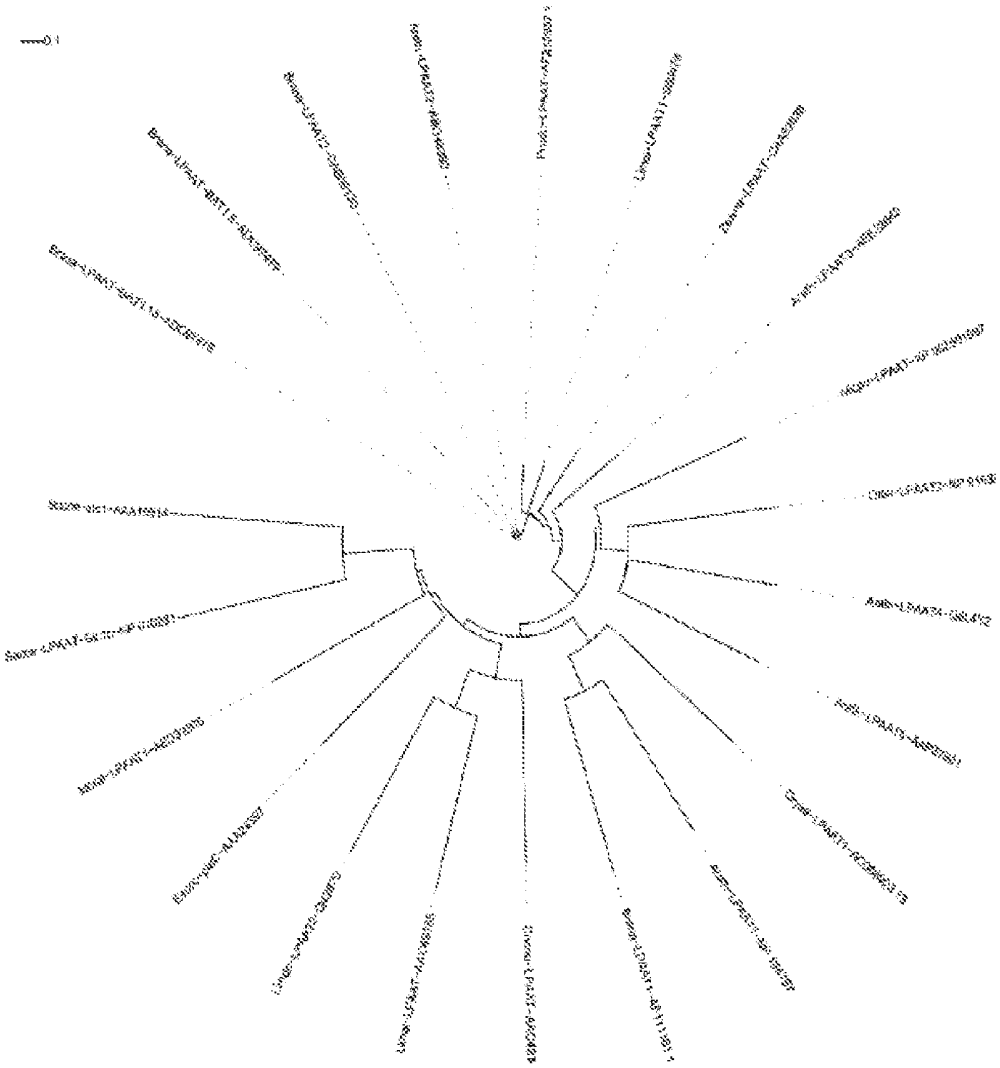


Figura 20

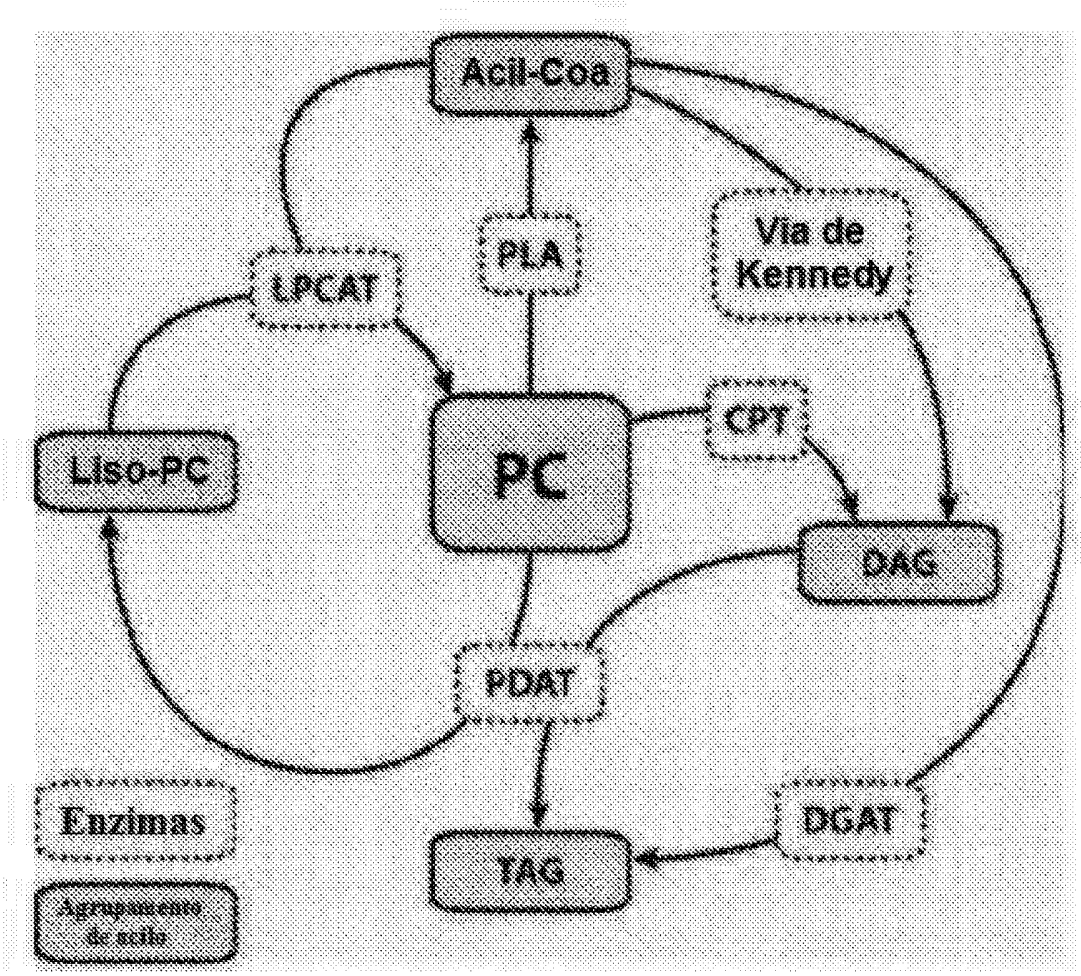

Acil-Coa
PLA
Via de Kennedy
LPCAT
CPT
Liso-PC
PC
DAG
PDAT
Enzimas
DGAT
TAG
Agrupamento de acilo

Figura 21