



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0311324-8 B1



(22) Data do Depósito: 21/05/2003

(45) Data de Concessão: 28/01/2020

(54) Título: POLINUCLEOTÍDEO, VETOR, POLIPEPTÍDEO COM ATIVIDADE DESSATURASE, MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE PLANTA E ÓLEO DE MILHO CONTENDO ÁCIDOS GRAXOS DE ÔMEGA-3, PARA AUMENTAR O VALOR NUTRICIONAL DE UM PRODUTO COMESTÍVEL, DE FABRICAÇÃO DE ALIMENTO OU ALIMENTAÇÃO, BEM COMO COMPOSIÇÃO COMESTÍVEL

(51) Int.Cl.: C12N 15/82; C12N 9/02; A01H 5/10.

(30) Prioridade Unionista: 07/03/2003 US 60/453,125; 22/05/2002 US 60/382,391.

(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC.

(72) Inventor(es): VIRGINIA M. URSIN; TONI VOELKER; BYRON FROMAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2003016144 de 21/05/2003

(87) Publicação PCT: WO 2003/099216 de 04/12/2003

(85) Data do Início da Fase Nacional: 22/11/2004

(57) Resumo: "DESSATURASES DE ÁCIDOS GRAXOS DE FUNGOS". A invenção refere-se geralmente a métodos e composições concernindo enzimas de dessaturase fúngica que modulam o número e localização de ligações duplas em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC-PUFA39>s). Em particular, a invenção refere-se a métodos e composições para melhorar os perfis de ácido graxo de ômega-3 em produtos e partes de planta empregando-se enzimas de dessaturase e ácidos nucleicos codificando para tais enzimas. Em modalidades particulares, as enzimas de dessaturase são 30>15-dessaturases fúngicas. São também fornecidas composições de óleo de canola tendo SDA e mantendo o teor de ácido oléico benéfico.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**POLINUCLEOTÍDEO, VETOR, POLIPEPTÍDEO COM ATIVIDADE DESSATURASE, MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE PLANTA E ÓLEO DE MILHO CONTENDO ÁCIDOS GRAXOS DE ÔMEGA-3, PARA AUMENTAR O VALOR NUTRICIONAL DE UM PRODUTO COMESTÍVEL, DE FABRICAÇÃO DE ALIMENTO OU ALIMENTAÇÃO, BEM COMO COMPOSIÇÃO COMESTÍVEL**".

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Este pedido reivindica a prioridade de Pedido de Patente Provisional dos Estados Unidos Serial nº 60/382.391, depositado em 22 de maio de 2002, e Pedido de Patente Provisional dos Estados Unidos Serial nº 60/453.125, depositado em 7 de março de 2003. A descrição inteira de cada dos pedidos acima é especificamente aqui incorporada por referência na totalidade.

Campo da Invenção

A invenção refere-se geralmente a enzimas de dessaturase que modulam o número e localização de ligações duplas em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFA's), métodos de uso destes e composições derivadas deles. Em particular, a invenção refere-se a perfis de ácido graxo melhorados empregando-se enzimas de dessaturase e ácidos nucléicos codificando para tais enzimas identificadas em fungos.

Descrição da Técnica Relacionada

Os produtos primários de biossíntese de ácido graxo na maioria dos organismos são compostos de 16 e 18 carbonos. A relação relativa de comprimentos de cadeia e grau de insaturação destes ácidos graxos varia amplamente entre as espécies. Os mamíferos, por exemplo, produzem primariamente ácidos graxos saturados e monossaturados, ao mesmo tempo em que a maioria das plantas mais altas produz ácidos graxos com um, dois ou três ligações duplas, as últimas duas compreendendo ácidos graxos poli-insaturados (PUFA's).

Duas famílias principais de PUFAs são os ácidos graxos de ômega-3 (também representados como ácidos graxos "n-3"), exemplificadas

por ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:4, n-3), e os ácidos graxos de ômega-6 (também representados como ácidos graxos "n-6), exemplificados por ácido araquidônico (ARA, 20:4, n-6). Os PUFA são componentes importantes das membrana de plasma da célula e tecido de adipose, onde eles podem
5 ser encontrados em tais formas como fosfolípídeos e como triglicerí-

deos, respectivamente. Os PUFAs são necessários para desenvolvimento apropriado em mamíferos, particularmente no desenvolvimento do cérebro infantil, e para formação de tecido e reparo.

Diversos distúrbios respondem ao tratamento com ácidos graxos. A suplementação com PUFAs tem sido mostrada reduzir a taxa de restenose após angioplastia. Os benefícios à saúde de certos ácidos graxos de ômega-3 dietéticos para doença cardiovascular e artrite reumatóide também têm sido bem documentados (Simopoulos, 1997; James e outros, 2000). Além disso, os PUFAs têm sido sugeridos para uso em tratamentos para asma e psoríase. Evidência indica que os PUFAs podem ser envolvidos em metabolismo de cálcio, sugerindo que os PUFAs podem ser úteis no tratamento ou prevenção de osteoporose e de pedras nos rins e no trato urinário. A maioria das evidências para benefícios à saúde aplica-se às gorduras de ômega-3 de cadeia longa, EPA e DHA que estão no peixe e óleo de peixe. Com esta base de evidência, autoridades de saúde e nutricionistas no Canadá (Scientific Review Committee, 1990, Nutrition Recommendations, Minister of National Health and Welfare, Canadá, Ottawa), Europe (de Deckker e outros, 1998), o Reino Unido (The British Nutrition Foundation, 1992, Ácidos graxos insaturados - significância nutricional e fisiológica: A reportagem do British Nutrition Foundation's Task Force, Chapman and Hall, Londres), e os Estados Unidos (Simopoulos e outros, 1999) têm recomendado o consumo dietético aumentado destes PUFAs.

Os PUFAs também podem ser empregados para tratar diabetes (Patente dos Estados Unidos nº 4.826.877; Horrobin e outros, 1993). O metabolismo alterado e composição do ácido graxo têm sido demonstrados em animais diabéticos. Estas alterações têm sugerido estarem envolvidas em algumas complicações a longo prazo resultando de diabetes, incluindo retinopatia, neuropatia, nefropatia e dano ao sistema reprodutivo. O óleo de prímula, que contém GLA, tem sido mostrado prevenir e reverter o dano ao nervo diabético.

Os PUFAs, tais como ácido linoléico (LA, 18:2, $\Delta 9$, 12) e ácido α -linolênico (ALA 18:3, $\Delta 9$, 12, 15), são considerados como ácidos graxos

essenciais na dieta porque os mamíferos não têm a capacidade de sintetizar estes ácidos. Entretanto, quando ingeridos, os mamíferos têm a capacidade de metabolizar LA e ALA para formar as famílias n-6 e n-3 de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC-PUFA). Estes LC-PUFA's são importantes componentes celulares conferindo fluidez às membranas e funcionando como precursores de eicosanóides biologicamente ativos tais como prostaglandinas, prostaciclina e leucotrienos, que regulam funções fisiológicas normais.

Em mamíferos, a formação de LC-PUFA's é limitada pela taxa pela etapa de dessaturação de $\Delta 6$, que converte LA em ácido γ -linolênico (GLA, 18:3, $\Delta 6, 9, 12$) e ALA em SDA (18:4, $\Delta 6, 9, 12, 15$). Muitas condições fisiológicas e patológicas têm sido mostradas deprimir esta etapa metabólica, e conseqüentemente, a produção de LC-PUFA. Entretanto, evitando a $\Delta 6$ -dessaturação por meio de suplementação dietética com EPA ou DHA pode eficazmente aliviar muitas doenças patológicas associadas com baixos níveis de PUFA. Entretanto, como mencionado em maiores detalhes abaixo, fontes atualmente disponíveis de PUFA não são desejáveis para uma multidão de razões. A necessidade para uma fonte segura e econômica de PUFA's tem estimulado interesse em fontes alternativas de PUFA's.

Os principais PUFAs de cadeia longa de importância incluem ácido docosaexaenóico (DHA, 22:6, n-3) e EPA, que são primariamente encontrados em tipos diferentes de óleo de peixe, e ácido araquidônico (ARA, 20:4, n-6), encontrado em fungos filamentosos. Para DHA, diversas fontes existem para produção comercial incluindo uma variedade de organismos marinhos, óleos obtidos de peixe marinho de água fria, e frações de gema de ovo. Fontes comerciais de SDA incluem os gêneros *Trichodesma* e *Echium*. Entretanto, existem diversas desvantagens associadas com produção comercial de PUFAs de fontes naturais. As fontes naturais de PUFAs, tais como animais e plantas, tendem a ter composições oleosas altamente heterogêneas. Por exemplo, óleo de sementes de *Echium*, em adição a SDA, contém níveis quase equivalentes do GLA de ácido graxo de ômega-6. Os óleos obtidos destas fontes portanto podem requerer purificação extensi-

va para separar um ou mais PUFAs desejados ou para produzir um óleo que é enriquecido em um ou mais PUFA.

As fontes naturais de PUFAs também são submetidas à flutuações incontroláveis em disponibilidade. Os estoques de peixe podem sofrer variação natural ou podem ser depauperados por pesca excessiva. Além disso, mesmo com evidência decisiva de seus efeitos terapêuticos, recomendações dietéticas com respeito aos ácidos graxos de ômega-3 não são observados. Os óleos de peixe têm gostos e odores desagradáveis, que podem ser impossíveis para economicamente separar do produto desejado, e podem tornar tais produtos inaceitáveis como suplementos de alimento. Óleos animais, e particularmente óleos de peixe, podem acumular poluentes ambientais. Os alimentos podem ser enriquecidos com óleos de peixe, porém novamente, tal enriquecimento é problemático por causa do custo e declínio nos estoques de peixe mundiais. Este problema é um impedimento ao consumo e ingestão de peixe inteiro. Todavia, se as mensagens de saúde para aumentar a ingestão de peixe fossem seguidas pelas comunidades, existiria provavelmente um problema em encontrar demanda de peixe. Entretanto, existem problemas com a sustentabilidade desta indústria que conta pesadamente com estoques de peixe silvestre para alimentação de cultura aquática. (Naylor e outros, 2000).

Outras limitações naturais favorecem um novo método para a produção de ácidos graxos de ômega-3. Condições meteorológicas e doença podem causar flutuação em produções de ambas as fontes de peixe e planta. Terra fértil disponível para a produção de colheitas de produção de óleo alternativas é submetida à competição de expansão estável de populações humanas e a necessidade aumentada associada para produção de alimento sobre a terra arável restante. Colheitas que produzem PUFAs, tal como borragem, não foram adaptadas ao crescimento comercial e não podem funcionar bem em monocultura. O crescimento de tais colheitas é desse modo não economicamente competitivo onde colheitas mais lucrativas e melhor estabelecidas podem ser desenvolvidas. Fermentação de organismos em larga escala tal como *Mortierella* é também cara. Tecidos animais

naturais contêm baixas quantidades de ARA e são difíceis de processar. Microorganismos tais como *Porphyridium* e *Mortierella* são difíceis de cultivar em uma escala comercial.

Diversas enzimas são envolvidas em biossíntese de PUFA. LA, (18:2, $\Delta 9$, 12) é produzido de ácido oléico (OA, 18:1, $\Delta 9$) por uma $\Delta 12$ -dessaturase enquanto ALA (18:3) é produzido de LA por uma $\Delta 15$ -dessaturase. SDA (18:4, $\Delta 6$, 9, 12, 15) e GLA (18:3, $\Delta 6$, 9, 12) são produzidos de LA e ALA por uma $\Delta 6$ -dessaturase. Entretanto, como acima estabelecido, mamíferos não podem dessaturar além da posição $\Delta 9$ e portanto não podem converter ácido oléico em LA. Igualmente, ALA não pode ser sintetizado por mamíferos. Outros eucariotas, incluindo fungos e plantas, têm enzimas que dessaturam na posição de carbono 12 e carbono 15. Os principais ácidos graxos poliinsaturados de animais, portanto são derivados de dieta por meio da dessaturação subsequente e alongamento de LA e ALA dietéticos.

A Patente dos Estados Unidos nº 5.952.544 descreve fragmentos de ácido nucléico isolados e clonados de *Brassica napus* que codificam enzimas ácido graxos dessaturase. A expressão de fragmentos de ácido nucléico da patente '544 é expressa em plantas e resulta no acúmulo de ALA. Entretanto, em plantas transgênicas expressando a $\Delta 15$ -dessaturase de planta, LA substancial permanece não convertida pela dessaturase. Uma enzima ativa mais ativa que converte mais LA em ALA seria vantajosa. A conversão aumentada de LA em ALA criaria quantidades maiores de ALA. Os níveis de ALA aumentados permitem a $\Delta 6$ -dessaturase, quando co-expressa com ácido nucléico codificando para a $\Delta 15$ -dessaturase, atuar sobre ALA, desse modo produzindo níveis maiores de SDA. Devido à multidão de usos benéficos para SDA, existe uma necessidade de criar um aumento substancial na produção de SDA. Os ácidos nucléicos de várias fontes têm sido procurados para aumentar a produção de SDA. Entretanto, inovações que permitiriam a produção comercial melhorada em colheitas com base na região são também altamente desejados. (Veja, por exemplo, Reed e outros, 2000). Além disso, o uso de polinucleotídeos de dessaturase derivados

de *Caenorhabditis elegans* (Meesapyodsuk e outros 200), não é ideal para a produção comercial de óleos de semente de planta enriquecidos.

Os ácidos nucléicos codificando $\Delta 15$ -dessaturases têm sido isolados de diversas espécies de cianobactérias e plantas, incluindo *Arabidopsis*, soja, e salsa. As seqüências de aminoácido deduzidas destas dessaturases demonstram um elevado grau de similaridade, mais notável na região de três motivos ricos em histidina que, sem ser limitado por qualquer uma teoria, são acreditados ser envolvidos em ligação de ferro. Entretanto, nenhuma $\Delta 15$ -dessaturase foi isolada de quaisquer espécies fúngicas. Além disso, mesmo com os genomas de diversas espécies fúngicas tendo sido seqüenciados, e empregando-se algoritmos sofisticados, pesquisas utilizando cDNA de $\Delta 15$ -dessaturase e seqüências de aminoácido contra bases de dados de DNA de *Neurospora* e *Aspergillus* não produziram $\Delta 15$ -dessaturases.

Portanto, seria vantajoso obter material genético envolvido em biossíntese de PUFA e expressar o material isolado em um sistema de planta, em particular, um sistema de planta de colheita terrestre com base na região, que possa ser manipulado para prover produção de quantidades comerciais de um ou mais PUFA's. Existe também uma necessidade de aumentar a ingestão de gordura ômega 3 em seres humanos e animais. Desse modo existe uma necessidade de fornecer uma ampla faixa de alimentos e suplementos de alimento enriquecidos com ômega 3, de modo que os indivíduos possam escolher a alimentação, ingredientes alimentares, alimentos e ingredientes de alimentos que adaptam-se a seus hábitos alimentares usuais. Atualmente, existe apenas um ácido graxo de ômega 3, ALA, disponível em óleos vegetais. Entretanto, existe conversão ruim de ALA ingerido nos ácidos graxos de ômega 3 de cadeia mais longa tal como EPA e DHA. Foi demonstrado em Pedido dos Estados Unidos de co-pendência Série nº 10/384.369 para "Tratamento e Prevenção de Distúrbios Inflamatórios", que elevando-se a ingestão de ALA pela comunidade na média de 1/g dia a 14 g/dia pelo uso de óleo de linhaça, apenas modestamente aumentou os níveis de EPA de fosfolípideo de plasma (Manzioris e outros, 1994).

Por conseguinte, para aquela finalidade, existe uma necessidade de produção eficiente e comercialmente viável de PUFA's empregando-se ácido graxo dessaturases, genes codificando-os, e métodos recombinantes de produzi-los. Existe também uma necessidade de óleos contendo proporções relativas mais elevadas de e/ou enriquecidos em PUFA's específicos e composições e suplementos alimentares contendo-os. Existe também uma necessidade de métodos econômicos seguros de produção de PUFA's específicos.

A despeito de ineficiências e baixas produções como acima descrito, a produção de ácidos graxos de ômega-3 por meio de cadeia alimentar terrestre é uma iniciativa benéfica à saúde pública e, em particular, a produção de SDA. O SDA em particular é importante, porque, como acima descrito, existe baixa conversão de ALA em EPA. Isto é porque neste processo de três enzimas (requerendo $\Delta 6$, $\Delta 12$, e $\Delta 15$) a enzima inicial, $\Delta 6$ -dessaturase, tem baixa atividade em seres humanos e é limitante da taxa. A evidência de que a $\Delta 6$ -dessaturase é limitante da taxa, é fornecida por estudos que demonstram que a conversão de seu substrato, ALA, é menos eficiente do que a conversão de seu produto, SDA em EPA em camundongos e ratos (Yamazaki e outros, 1992; Huang, 1991).

Com base em tais estudos, é observado que em colheitas de semente oleosa comerciais, tais como canola, soja, milho, girassol, açafrão, ou linho, a conversão de alguma fração dos ácidos graxos mono- e poliinsaturados que representam seu óleo de semente em SDA, requer a expressão específica de semente de múltiplas enzimas de dessaturase, incluindo $\Delta 6$ - e $\Delta 12$, e uma enzima que tem atividade de $\Delta 15$ -dessaturase. Óleos derivados de plantas expressando níveis elevados de $\Delta 6$, $\Delta 12$, e $\Delta 15$ -dessaturases são ricos em SDA e outros ácidos graxos de ômega-3. Tais óleos podem ser utilizados para produzir alimentos e suplementos alimentares enriquecidos em ácidos graxos de ômega-3 e o consumo de tais alimentos eficazmente aumenta os níveis de tecido de EPA e DHA. Alimentos e gêneros alimentícios, tais como leite, margarina e salsichas, todos feitos ou preparados com óleos enriquecidos por ômega 3 resultarão em benefíci-

os terapêuticos. Tem sido mostrado que indivíduos podem ter uma ingestão de ômega 3 comparável com EPA e DHA de pelo menos 1,8 g/dia sem alterar seus hábitos alimentares utilizando alimentos contendo óleos enriquecidos com ácidos graxos de ômega 3 (Nailor, supra). Desse modo, existe uma forte necessidade de ácidos nucleicos novos de $\Delta 15$ -dessaturases para uso em plantas de colheita transgênica para produzir óleos enriquecidos em PUFA's. Novos óleos de semente de planta enriquecidos para PUFA's e, em particular, ácidos graxos de ômega 3 tais como ácido estearidônico são similarmente necessários.

10 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em um aspecto, a invenção fornece ácidos nucleicos isolados codificando um polipeptídeo capaz de dessaturar uma molécula de ácido graxo no carbono 15 ($\Delta 15$ -dessaturase). Estes podem ser empregados para transformar células ou modificar a composição de ácido graxo de uma planta ou o óleo produzido por uma planta. Uma modalidade da invenção é uma sequência de polinucleotídeo isolada, isolada de uma espécie fúngica tendo atividade de dessaturase única. Os polinucleotídeos isolados podem ser isolados de espécies fúngicas preferivelmente pertencentes a um filo selecionado do grupo consistido em zigomicota, basidiomicota, e ascomicota. Em certas modalidades, os polinucleotídeos isolados são isolados de uma espécie fúngica selecionada do grupo consistindo em *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, e *Botrytis cinerea*.

Em outro aspecto, a invenção fornece um polinucleotídeo isolado compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo em: (a) um polinucleotídeo codificando o polipeptídeo de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:34; (b) um polinucleotídeo compreendendo a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO: 33; (c) um polinucleotídeo hibridizando para uma ou mais de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO: 33, ou um complemento destas, sob condições de 5X SSC, 50% de formamida e 42°C; e (d) um polinucleotídeo fúngico codificando um polipeptídeo tendo pelo menos um dos motivos de aminoácido: TrpIleLeuAlaHisGluCysGlyHisGlyAlaSerPhe (WI-

LAHECGHGASF) (SEQ ID NO:6); LeuAlaHisGluCysGlyHis (LAHECGH)
(SEQ ID NO:7); HisSerPheLeuLeuValProTyrPheSerTrpLys
(HSFLLVPYFSWK) (SEQ ID NO:8); LeuLeuValProTyrPheSerTrpLys
(LLVPYFSWK) (SEQ ID NO:9); His(His/Ala)ArgHisHisArg(Phe/Tyr)ThrThr
5 (H(H/A)RHHR(F/Y)TT) (SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, ou
SEQ ID NO:21); TrpValHisHisTrpLeuValAlalleThrTyrLeu(His/Gln)HisThrHis
(WVHHWLVAITYL(H/Q)HTH) (SEQ ID NO:11); AlalleThrTyr-
Leu(His/Gln)HisThr (AITYL(H/Q)HT) (SEQ ID NO:12); GlyAlaLeuAlaThrVa-
lAspArg (GALATVDR) (SEQ ID NO:13) ou HisValValHisHisLeuPheXaaArgI-
10 leProPheTyr (HVVHHLFXRIPFY) (SEQ ID NO:14 ou SEQ ID NO:22).

Em ainda outro aspecto, a invenção fornece um vetor recombi-
nante compreendendo um polinucleotídeo isolado de acordo com a inven-
ção. O termo "vetor recombinante" como aqui empregado, inclui qualquer
segmento recombinante de DNA que alguém deseja introduzir em uma cé-
15 lula hospedeira, tecido e/ou organismo, e especificamente inclui cassetes de
expressão isolados de um polinucleotídeo de partida. Um vetor recombi-
nante pode ser linear ou circular. Em vários aspectos, um vetor recombi-
nante pode compreender pelo menos uma sequência adicional escolhida do
grupo consistindo em: seqüências reguladoras operativamente acopladas ao
20 polinucleotídeo; marcadores de seleção operativamente acoplados ao poli-
nucleotídeo; seqüências marcadoras operativamente acopladas ao polinu-
cleotídeo; uma porção de purificação operativamente acoplada ao polinu-
cleotídeo; e uma seqüência de alvejamento operativamente acoplada ao poli-
nucleotídeo.

25 Todavia, em ainda outro aspecto, a invenção provê células, tal
como células mamíferas, de planta, de inseto, de levedura e de bactérias
transformadas com os polinucleotídeos da presente invenção. Em uma outra
modalidade, as células são transformadas com vetores recombinantes con-
tendo promotores constitutivos e específicos do tecido além dos polinucleo-
30 tídeos da presente invenção. Em certas modalidades da invenção, tais cé-
lulas podem ser também definidas como transformadas com uma seqüência
de ácido nucléico codificando um polipeptídeo tendo atividade de dessatura-

se que dessatura uma molécula de ácido graxo no carbono 6.

Todavia em ainda outro aspecto, a invenção fornece um polipeptídeo, incluindo fragmentos e proteínas tendo atividade de dessaturase que dessatura uma molécula de ácido graxo no carbono 15. Em uma modalidade da invenção, o polipeptídeo compreende pelo menos um dos motivos de aminoácido: TrpIleLeuAlaHisGluCysGlyHisGlyAlaSerPhe (WILAHECGHGASF) (SEQ ID NO:6); LeuAlaHisGluCysGlyHis (LAHECGH) (SEQ ID NO:7); HisSerPheLeuLeuValProTyrPheSerTrpLys (HSFLLVPYFSWK) (SEQ ID NO:8); LeuLeuValProTyrPheSerTrpLys (LLVPYFSWK) (SEQ ID NO:9); His(His/Ala)ArgHisHisArg(Phe/Tyr)ThrThr (H(H/A)RHHR(F/Y)TT) (SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, ou SEQ ID NO:21); TrpValHisHisTrpLeuValAlaIleThrTyrLeu(His/Gln)HisThrHis (WVHHWLVAITYL(H/Q)HTH) (SEQ ID NO:11); AlaIleThrTyrLeu(His/Gln)HisThr (AITYL(H/Q)HT) (SEQ ID NO:12); GlyAlaLeuAlaThrValAspArg (GALATVDR) (SEQ ID NO:13) ou HisValValHisHisLeuPheXaaArgIleProPheTyr (HVVHHLFXRIPFY) (SEQ ID NO:14 ou SEQ ID NO:22). Em outras modalidades, o polipeptídeo é também definido como compreendendo todos os referidos motivos de aminoácido. A invenção também fornece um polipeptídeo fúngico compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:34; ou um fragmento destas tendo atividade de dessaturase que dessatura uma molécula de ácido graxo no carbono 15.

Todavia ainda outro aspecto da invenção fornece um método de produzir óleo de semente contendo ácidos graxos de ômega-3 de sementes de planta, compreendendo as etapas de (a) obtenção de sementes de uma planta de acordo com a invenção; e (b) extração do óleo das referidas sementes. Exemplos de uma tal semente de planta incluem canola, milho de soja, sojas, semente de colza, girassol, cacau, amendoim, açafoa, coco, linho, palma oleosa, semente oleosa de *Brassica napus*, e milho. Os métodos preferidos de transformar tais células de planta incluem o uso de plasmídeos Ti e Ri de *Agrobacterium*, eletroporação, e bombardeio balístico de elevada velocidade.

Todavia, em ainda outro aspecto, um método é fornecido de

produzir uma planta compreendendo óleo de semente contendo níveis alterados de ácidos graxos de ômega-3 compreendendo introduzir o vetor recombinante da invenção em uma planta de produção de óleo. No método, a introdução de vetor recombinante pode compreender reproduzir planta e

5 pode compreender as etapas de: (a) transformação de uma célula de planta com o vetor recombinante; e (b) regeneração da referida planta da célula de planta, onde a planta tem níveis alterados de ácidos graxos de ômega-3. No método, a planta pode, por exemplo, ser selecionada do grupo consistindo em *Arabidopsis thaliana*, *Brassica* de semente oleosa, semente de colza,

10 girassol, açafrão, canola, milho, soja, algodão, linho, jojoba, árvore de sebo Chinesa, tabaco, cacau, amendoim, plantas frutíferas, plantas cítricas, e plantas de produção de nozes e bagas. A planta pode ser também definida como transformada com uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo tendo atividade de dessaturase que dessatura uma molécula

15 de ácido graxo no carbono 6 e a planta pode ter SDA aumentado. O método pode também ainda compreender introduzir o vetor recombinante em uma pluralidade de plantas de produção de óleo e analisar as plantas ou pro- gênie destas tendo herdado o vetor recombinante para uma planta tendo um perfil desejado de ácidos graxos de ômega-3.

20 Todavia, em ainda outro aspecto, a invenção fornece um óleo de semente de canola endógeno tendo um teor de SDA de cerca de 8% a cerca de 27% e um teor de ácido oléico de cerca de 40% a cerca de 70%. Em certas modalidades, o óleo de semente de canola pode ser também definido como compreendendo menos do que 10% de ácido de ALA, LA e GLA com-

25 binados. O óleo pode também compreender um teor de SDA também definido como de cerca de 10% a cerca de 20%, incluindo de cerca de 12% a cerca de 20%, cerca de 15% a cerca de 20%, cerca de 10% a cerca de 17% e cerca de 12% a cerca de 17%. Em ainda outras modalidades da invenção, o óleo de semente de canola pode ter um teor de ácido oléico também defi-

30 nido como de cerca de 45% a cerca de 65%, incluindo de cerca de 50% a cerca de 65%, de cerca de 50% a cerca de 60% e de cerca de 55% a cerca de 65%. Em ainda outras modalidades da invenção, o teor de SDA é tam-

bém definido como de cerca de 12% a cerca de 17% e o teor de ácido oléico é também definido como de cerca de 55% a cerca de 65%. Em uma modalidade da invenção, um óleo de semente de canola é de semente de *Brassica napus* ou *Brassica rapa*. Em certas modalidades, um óleo fornecido tem uma relação de ácidos graxos de ômega-6 para ômega-3 de cerca de 1:1 a cerca de 1:4, incluindo de cerca de 1:2 a cerca de 1:4.

Todavia em ainda outro aspecto, a invenção fornece um método de aumentar o valor nutricional de um produto comestível para consumo humano ou animal, compreendendo adicionar um óleo de semente de canola fornecido pela invenção ao produto comestível. Em certas modalidades, o produto é alimento humano e/ou animal. O produto comestível pode também ser alimento animal e/ou um suplemento alimentar. No método, o óleo de semente de canola pode aumentar o teor de SDA do produto comestível e/ou pode diminuir a relação de ácidos graxos de ômega-6 para ômega-3 do produto comestível. O produto comestível pode não ter SDA antes de adicionar o óleo de semente de canola.

Todavia em ainda outro aspecto, a invenção fornece um método de fabricar alimento ou alimentação, compreendendo adicionar um óleo de semente de canola fornecido pela invenção para os ingredientes de alimentação ou alimento de partida para produzir o alimento ou alimentação. Em certas modalidades, o método é também definido como um método de fabricação de alimento e/ou alimentação. A invenção também fornece alimento ou alimentação fabricado pelo método.

Todavia, em ainda outro aspecto, a invenção compreende um método de fornecer SDA a um humano ou animal, compreendendo administrar o óleo de semente de canola de reivindicação 1 ao referido humano ou animal. No método, o óleo de semente de canola pode ser administrado em uma composição comestível, incluindo alimento ou alimentação. Exemplos de alimento incluem bebidas, alimentos infundidos, molhos, condimentos, molhos de salada, sucos de fruta, xaropes, sobremesas, glacê e recheios, produtos congelados macios, confeitados ou alimento intermediário. A composição comestível pode ser substancialmente um líquido ou sólido. A compo-

sição comestível pode também ser um suplemento alimentar e/ou nutracêutico. No método, o óleo de semente de canola pode ser administrado as um humano e/ou um animal. Exemplos de animais aos quais o óleo pode ser administrado incluem gado ou aves domésticas.

5 **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

Os seguintes desenhos fazem parte do presente relatório e são incluídos para também demonstrar certos aspectos da presente invenção. A invenção pode ser melhor entendida por referência a um ou mais destes desenhos em combinação com a descrição detalhada de modalidades específicas aqui apresentadas. A invenção pode ser mais totalmente entendida a partir da seguinte descrição das figuras:

FIGURA 1 mostra a região de codificação NcD15D de $\Delta 15$ -dessaturase fúngica em um cassete de pCR2.1 cassette (pMON67004).

FIGURA 2 mostra a região de codificação NcD15D de $\Delta 15$ -dessaturase fúngica no vetor de expressão de levedura pYES 2.1 (pMON77208).

FIGURA 3 mostra os níveis de ALA em 200 meias-sementes (sementes cortadas pela metade), ordenados do menor para o maior ALA.

FIGURA 4 mostra um diagrama de fluxo ou mapas de plasmídeo resultando em plasmídeos pMON77214 e pMON77217.

FIGURA 5 mostra um dendrograma exemplar de polipeptídeos de dessaturase, incluindo $\Delta 15$ -dessaturase de *N. crassa*.

FIGURA 6 mostra um alinhamento de sequência de polipeptídeos de dessaturase exemplares relativo à $\Delta 15$ -dessaturase de *N. crassa*.

FIGURA 7A-7G mostra mapas de plasmídeo de construções preparadas.

25 **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A invenção supera as limitações da técnica anterior fornecendo métodos e composições para criação de plantas com teor de PUFA melhorado. A modificação de teor de ácido graxo de um organismo tal como uma planta apresenta muitas vantagens, incluindo benefícios de nutrição e saúde melhorados. A modificação do teor de ácido graxo pode ser empregada para obter níveis ou perfis benéficos de PUFA's desejados em plantas, partes de planta, e produtos de planta, incluindo óleos de semente de planta. Por

exemplo, quando os PUFA's desejados são produzidos em tecido de semente de uma planta, o óleo pode ser isolado das sementes tipicamente resultando em um óleo elevado em PUFAs desejado ou um óleo tendo um teor ou perfil de ácido graxo desejado, que pode por sua vez fornecer características benéficas em gêneros alimentícios e outros produtos. A invenção em particular fornece óleo de canola endógeno tendo SDA ao mesmo tempo que contendo teor de ácido oléico benéfico.

Vários aspectos da invenção incluem métodos e composições para modificação do teor de PUFA de uma célula, por exemplo, modificação do teor de PUFA de uma célula(s) de planta. Composições relacionadas com a invenção incluem novas seqüências de polinucleotídeo isoladas, constructos de polinucleotídeo e plantas e/ou partes de planta transformadas por polinucleotídeos da invenção. O polinucleotídeo isolado pode codificar dessaturases de ácido graxo fúngico e, em particular podem codificar uma $\Delta 15$ -dessaturase fúngica. Células hospedeiras podem ser manipuladas para expressar um polinucleotídeo codificando um polipeptídeo(s) de dessaturase que catalisam dessaturação de um ácido(s) graxo(s).

Alguns aspectos da invenção incluem vários polipeptídeos de dessaturase e polinucleotídeos codificando os mesmos. Várias modalidades da invenção podem empregar uma combinação de polinucleotídeos de dessaturase e os polipeptídeos codificados que tipicamente dependem da célula hospedeira, a disponibilidade de substrato(s), e o(s) produtos finais desejados. "Dessaturase" refere-se a um polipeptídeo que pode dessaturar ou catalisar a formação de uma ligação dupla entre carbonos consecutivos de um ou mais ácidos graxos para produzir um ácido graxo mono- ou poli-insaturado ou precursor deste. De particular interesse são os polipeptídeos que podem catalisar a conversão de ácido esteárico em ácido oléico, ácido oléico em LA, LA em ALA, ou ALA em SDA, que inclui enzimas que dessaturam nas 12, 15 ou 6 posições. O termo "polipeptídeo" refere-se a qualquer cadeia de aminoácidos, independente de modificação pós-translacional e de comprimento (*por exemplo*, glicosilação ou fosforilação). Considerações para escolha de um polipeptídeo específico tendo atividade de dessaturase

incluem porém não estão limitadas ao pH ideal do polipeptídeo, se o polipeptídeo é uma enzima limitante da taxa ou um componente desta, se a dessaturase empregada é essencial para síntese de um PUFA desejado, e/ou um co-fator é requerido pelo polipeptídeo. O polipeptídeo expresso preferivelmente tem características que são compatíveis com o ambiente bioquímico de sua localização na célula hospedeira. Por exemplo, o polipeptídeo pode ter que competir para o(s) substrato(s)

Análises do K_m e atividade específica de um polipeptídeo em questão podem ser consideradas na determinação da adequabilidade de um determinado polipeptídeo para modificar a produção, nível ou perfil de PUFA(s) em uma determinada célula hospedeira. O polipeptídeo empregado em uma situação particular é um que tipicamente pode funcionar sob as condições presentes na célula hospedeira pretendida, porém de outra maneira pode ser qualquer polipeptídeo de dessaturase tendo uma característica desejada ou sendo capaz de modificar a produção relativa, nível ou perfil de PUFA(s) desejado(s) ou quaisquer outras características desejadas como aqui escrito. O(s) substrato(s) para a enzima expressa pode(m) ser produzido(s) pela célula hospedeira ou pode(m) ser exogenamente suprido(s). Para obter expressão, o(s) polipeptídeo(s) da presente invenção são codificados por polinucleotídeos como abaixo descrito.

Os inventores têm isolado e produzido enzimas de origem fúngica que exibem atividade de $\Delta 15$ -dessaturase. As fontes fúngicas incluem, porém não estão limitadas ao gênero *Aspergillus*, por exemplo, *Aspergillus nidulans*; o gênero *Botrytis*, por exemplo, *Botrytis cinerea*; o gênero *Neurospora*, por exemplo, *Neurospora crassa*; e outros fungos que exibem atividade de $\Delta 15$ -dessaturase.

De particular interesse são $\Delta 15$ -dessaturase(s) de *Neurospora crassa* e/ou *Aspergillus nidulans*. A sequência de aminoácido da $\Delta 15$ -dessaturase de *N. crassa*, mencionada na SEQ ID NO:3 e codificada pela sequência de nucleotídeo na SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2, foi determinada ter um peso molecular de aproximadamente 49.123.37 Dáltons. A sequência consiste de 429 aminoácidos; 32 dos quais são fortemente básicos (lisina,

arginina); 35 dos quais são fortemente ácidos (ácido aspártico, ácido glutâmico); 170 aminoácidos hidrofóbicos (alanina, isoleucina, leucina, fenilalanina, triptofano, valina); e 100 aminoácidos polares (asparagina, cisteína, glutamina, serina, treonina, tirosina). A SEQ ID NO:3 tem um ponto isoelétrico de 7.187; uma carga de 1.634 em pH 7.0; uma Temperatura de Fusão Roth, Davis, Botsein de 89,65°C e uma Temperatura Wallace de 5098,00.

A seqüência de aminoácido da $\Delta 15$ -dessaturase de *A. nidulans*, mencionada na SEQ ID NO:5 e codificada pela seqüência de ácido nucléico mencionada na SEQ ID NO:4, foi determinada ter um peso molecular de aproximadamente 46.300 Dáltons. A seqüência consiste em 401 aminoácidos; dos quais 31 são fortemente básicos (lisina, arginina); 34 são fortemente básicos (ácido aspártico, ácido glutâmico); 161 aminoácidos hidrofóbicos (alanina, isoleucina, leucina, fenilalanina, triptofano, valina); e 100 aminoácidos polares (asparagina, cisteína, glutamina, serina, treonina, tirosina). SEQ ID NO:5 tem um ponto isoelétrico de 6.83.

As seqüências codificando a $\Delta 15$ -dessaturase de *Neurospora crassa* e/ou de *Aspergillus nidulans* podem ser expressas em plantas transgênicas, microorganismo ou animais para executar síntese maior de ALA de LA, bem como SDA. Outros polinucleotídeos que são substancialmente idênticos para o polinucleotídeo de $\Delta 15$ -dessaturase de *N. crassa* e/ou de *A. nidulans*, ou que codificam polipeptídeos que são substancialmente idênticos ao polipeptídeo de $\Delta 15$ -dessaturase de *N. crassa* e/ou de *A. nidulans*, também podem ser empregados. "Substancialmente idêntica" refere-se a uma seqüência de aminoácido ou seqüência de ácido nucléico na ordem de preferência crescente pelo menos 80%, 90% ou 95% de identidade com a seqüência de aminoácido ou seqüência de ácido nucléico codificando a seqüência de aminoácido de $\Delta 15$ -dessaturase da *N. crassa* e/ou da *A. nidulans*. As comparações de polipeptídeo ou polinucleotídeo podem ser executadas empregando-se *software* de análise de seqüência, por exemplo, o pacote de *software* de Análise de Seqüência do GCG Wisconsin Package (Accelrys, San Diego, CA), MEGAlign (DNASTar, Inc., 1228 S. Park St., Madison, Wis. 53715), e Mac Vector (Oxford Molecular Group, 2105 S. Bascom Avenue,

Suite 200, Campbell, Calif. 95008). Tal *software* compara seqüências similares designando-se os graus de similaridade ou identidade.

5 Abrangidas pela presente invenção estão as dessaturases relacionadas do mesmo ou outros organismos relacionados. Tais dessaturases relacionadas incluem variantes das $\Delta 15$ -dessaturases descritas de ocorrência natural dentro da mesma ou diferentes espécies de fungo. As dessaturases relacionadas podem ser identificadas por sua capacidade de funcionar substancialmente igual às dessaturases descritas; isto é, são ainda capazes de eficazmente converter LAS em ALA e GLA em SDA. As dessaturases
10 relacionadas também podem ser identificadas analisando-se as bases de dados de seqüência quanto às seqüências homólogas às dessaturases, por hibridização de uma sonda com base nas dessaturases descritas para uma biblioteca construída do organismo fonte, ou por RT-PCR empregando-se mRNA do organismo fonte e iniciadores com base nas dessaturases des-
15 critas.

 Certos aspectos da invenção incluem variantes e fragmentos de um polipeptídeo de $\Delta 15$ -dessaturase fúngico e os ácidos nucléicos codificando tal que retenha a atividade de dessaturase. Em outro aspecto da invenção, um vetor contendo um ácido nucléico, ou fragmento deste, contendo um promotor, uma seqüência de codificação de $\Delta 15$ -dessaturase e uma
20 região de terminação podem ser transferidos para dentro de um organismo no qual o promotor e as regiões de terminação sejam funcionais. Consequentemente, organismos produzindo $\Delta 15$ -dessaturase recombinante são fornecidos por esta invenção. Todavia, outro aspecto desta invenção fornece $\Delta 15$ -dessaturase isolada, que pode ser purificada dos organismos re-
25 combinantes por métodos padrão de purificação de proteína. (Por exemplo, veja Ausubel e outros, 1987).

 Vários aspectos da invenção incluem seqüências de ácido nucléico que codificam dessaturases, aqui descritas. Os ácidos nucléicos podem ser isolados de fungos incluindo, porém não limitados a *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea* e similares. Os genomas destes fungos foram todos seqüenciados e foi determinado que cada qual é rico
30

em ALA. A estratégia de clonagem com base nos iniciadores de oligonucleotídeo designados para amplificar seqüências identificadas como ácido graxo dessaturases potenciais, com base nas pesquisas BLAST da base de dados de DNA genômico de *N. crassa*, pode ser empregada para seqüenciar clones individuais. Estes clones podem então ser funcionalmente caracterizados.

Os constructos de ácido nucléico podem ser fornecidas, as quais integram-se dentro do genoma de uma célula hospedeira ou são autonomamente replicadas (por exemplo, episomicamente replicadas) na célula hospedeira. Para a produção de ALA e/ou SDA, os cassetes de expressão (*isto é*, um polinucleotídeo codificando uma proteína que é operativamente ligada às seqüência(s) de ácido nucléico que direcionam a expressão do polinucleotídeo), geralmente empregados incluem um cassete de expressão que provê a expressão de um polinucleotídeo codificando uma $\Delta 15$ -dessaturase. Em certas modalidades, uma célula hospedeira pode ter teor de ácido oléico tipo silvestre.

Métodos e composições para a construção de vetores de expressão, quando adotados na luz dos ensinamentos aqui fornecidos, para expressão de enzimas de dessaturase fúngicas estarão evidentes para alguém versado na técnica. Vetores de expressão, como aqui descrito, são moléculas de DNA ou RNA construídas para expressão controlada de um polinucleotídeo desejado, *por exemplo*, a $\Delta 15$ -dessaturase codificando polinucleotídeo. Exemplos de vetores incluem plasmídeos, bacteriófagos, cosmídeos ou viroses. Vetores lançadeira, *por exemplo*, (Wolk e outros. 1984; Bustos e outros, 1991) são também contemplados de acordo com a presente invenção. Revisões de vetores e métodos para preparar e empregá-los podem ser encontrados em Sambrook e outros (1989); Goeddel (1990); e Perbal (1988). Elementos de seqüência capazes de realizar a expressão de um polinucleotídeo incluem promotores, elementos realçadores, seqüências de ativação a montante, sinais de terminação de transcrição e sítios de poliadenilação.

Polinucleotídeos codificando dessaturases podem ser colocados

sob controle transcricional de um promotor forte. Em alguns casos isto induz a um aumento na quantidade de enzima dessaturase expressa e concomitantemente um aumento no ácido graxo produzido como um resultado da reação catalisada pela enzima. Existe uma ampla variedade de seqüências promotoras que podem ser empregadas para direcionar a expressão específica do tecido de polinucleotídeos codificando dessaturases em plantas transgênicas. Por exemplo, o promotor *napin* e os promotores de proteína transportadores de acila foram previamente empregados na modificação de composição de óleo de semente por expressão de uma forma anti-sentido de uma dessaturase (Knutzon e outros 1999). Similarmente, o promotor para a subunidade β de β -conglucina de soja foi mostrado ser altamente ativo e resultar em expressão específica do tecido em plantas transgênicas de espécies exceto a soja (Bray e outros, 1987). Arondel e outros (1992) aumentaram a quantidade de ácido linolênico (18:3 em tecidos de plantas de *Ara-*
bidopsis transgênicas colocando-se o gene *fad3* localizado do retículo endoplasmico sob controle transcricional do promotor 35S do vírus mosaico de couve-flor constitutivo fonte

O técnico ordinariamente experiente pode determinar vetores e elementos reguladores (incluindo regiões de codificação e promotores operavelmente ligados) adequados para expressão em uma célula hospedeira particular. "Operavelmente ligado" neste contexto significa que o promotor e seqüências terminadoras eficazmente funcionam para regular a transcrição. Como um outro exemplo, um vetor apropriado para expressão de $\Delta 15$ -dessaturase em plantas transgênicas pode compreender uma seqüência promotora específica da semente derivada de heliantina, *napin*, ou glicina operavelmente ligada à região de codificação de $\Delta 15$ -dessaturase e também operavelmente ligada a um sinal de terminação de proteína de estocagem de semente ou ao sinal de terminação de sintase de nopalina. Também como um outro exemplo, um vetor para uso em expressão de $\Delta 15$ -dessaturase em plantas pode compreender um promotor constitutivo ou um promotor específico de tecido operavelmente ligado à região de codificação de $\Delta 15$ -dessaturase e também operavelmente ligado a um terminador cons-

titutivo ou específico de tecido ou ao sinal de terminação de sintase de nopalina.

Modificações das seqüências de nucleotídeo ou elementos reguladores aqui descritos que mantêm as funções aqui contempladas incluem-se no escopo desta invenção. Tais modificações incluem inserções, substituições e deleções, e especificamente substituições que refletem a degeneração do código genético.

Técnicas padrão para a construção de tais vetores recombinantes são bem conhecidas por aqueles versados na técnica e podem ser encontradas em referências tais como Sambrook e *outros* (1989), ou qualquer dos miríades de manuais de laboratório sobre a tecnologia de DNA recombinante que estão amplamente disponíveis. Uma variedade de estratégias está disponível para ligar fragmentos de DNA, a escolha dos quais depende da natureza das terminações dos fragmentos de DNA. É também contemplado de acordo com a presente invenção incluir em um vetor de ácido nucleico outros elementos de seqüência de nucleotídeo que facilitam clonagem, expressão ou processamento, por exemplo seqüências codificando peptídeos sinal, uma seqüência codificando KDEL, o que é requerido para retenção de proteínas no retículo endoplasmático ou seqüências codificando peptídeos de trânsito que direcionam a $\Delta 15$ -dessaturase para o cloroplasto. Tais seqüências são conhecidas por aquele versado na técnica. Um peptídeo de trânsito otimizado é descrito, por exemplo, por Van den Broeck e *outros* (1985). Seqüências sinal procarióticas e eucarióticas são descritas, por exemplo, por Michaelis e *outros* (1982).

Em certas modalidades, os cassetes de expressão podem incluir um cassete que provenha para subsistência da atividade de $\Delta 6$ - e/ou $\Delta 15$ -dessaturase, particularmente em uma célula hospedeira que produza ou possa compreender LA ou ALA, respectivamente. A produção de ácidos graxos insaturados tipo ômega 6, tal como LA, é favorecida em um organismo hospedeiro que é incapaz de produzir ALA. A produção de ALA hospedeiro pode ser removida, reduzida e/ou inibida inibindo-se a atividade de uma $\Delta 15$ -dessaturase. Isto pode ser executado por seleção padrão, forne-

cendo um cassete de expressão para uma $\Delta 15$ -dessaturase anti-sentido, rompendo-se um gene de $\Delta 15$ -dessaturase alvo por meio de inserção, deleção, substituição de parte ou o todo do gene alvo, ou adicionando-se um inibidor de $\Delta 15$ -dessaturase. Similarmente, a produção de LA ou ALA é favorecida em um microorganismo ou animal tendo atividade de $\Delta 6$ -dessaturase provendo um cassete de expressão para uma transcrição $\Delta 6$ anti-sentido, rompendo-se um gene de $\Delta 6$ -dessaturase, ou pelo uso de um inibidor de $\Delta 6$ -dessaturase.

Polinucleotídeos codificando dessaturases desejadas podem ser identificados de diversas maneiras. Como um exemplo, uma fonte da dessaturase desejada, por exemplo, bibliotecas genômicas ou de cDNA de *Neurospora*, são analisadas com sondas enzimaticamente ou quimicamente sintetizadas detectáveis, que podem ser feitas de DNA, RNA, ou nucleotídeos de ocorrência não natural, ou misturas destes. Sondas podem ser sintetizadas enzimática de polinucleotídeos de dessaturases conhecidas para métodos de hibridização de rigorosidade normal ou reduzida. As sondas de oligonucleotídeo também podem ser empregadas para analisar fontes e podem ser baseadas nas seqüências de dessaturases conhecidas, incluindo seqüências conservadas entre dessaturases conhecidas, ou sobre seqüências de peptídeo obtidas das proteína purificada desejada. As sondas de oligonucleotídeo com base nas seqüências de aminoácido podem ser degeneradas para abranger a degeneração do código genético, ou podem tender em favor dos códons preferidos do organismo fonte. Os oligonucleotídeos também podem ser empregados como iniciadores para PCR de mRNA transcrito reverso de uma fonte conhecida ou suspeita; o produto PCR pode ser o cDNA de tamanho natural ou pode ser empregado para gerar uma sonda para obter o cDNA de tamanho natural desejado. Alternativamente, uma proteína desejada pode ser totalmente seqüenciada e a síntese total de um DNA codificando aquele polipeptídeo representado.

Uma vez que o cDNA ou genômico desejado foi isolado, ele pode ser seqüenciado por métodos conhecidos. É reconhecido na técnica que tais métodos são objeto de erros, tal que seqüenciamento múltiplo da

mesma região seja rotina e seja também esperado induzir a taxas mensuráveis de erros na seqüência deduzida resultante, particularmente em regiões tendo domínios repetidos, estrutura secundária extensa, ou composições de base não usuais, tais como regiões com teor de base GC elevado. Quando discrepâncias surgem, ressequenciamento pode ser feito e pode empregar métodos especiais. Métodos especiais podem incluir alterar condições de sequenciamento empregando-se: temperaturas diferentes; enzimas diferentes; proteínas que alteram a capacidade de oligonucleotídeos formarem estruturas de ordem maiores; nucleotídeos alterados tais como ITP ou dGTP metilado; composições de gel diferentes, por exemplo, adicionando-se formamida; iniciadores diferentes ou iniciadores localizados em diferentes distâncias da região problema; ou padrões diferentes tais como DNAs de filamento único. Sequenciamento de mRNA também pode ser empregado.

Algumas ou todas as seqüências de codificação para um polipeptídeo tendo atividade de dessaturase pode ser de uma fonte natural. Em algumas situações, entretanto, é desejável modificar o todo ou uma porção dos códons, por exemplo, para realçar expressão, empregando-se códons hospedeiros preferidos. Os códons hospedeiros preferidos podem ser determinados de códons de frequência mais elevada nas proteínas expressas na quantidade maior em uma espécie hospedeira particular de interesse. Desse modo, a seqüência de codificação para um polipeptídeo tendo atividade de dessaturase pode ser sintetizada no todo ou em parte. O todo ou porções do DNA também podem ser sintetizados para remover quaisquer seqüências desestabilizantes ou regiões de estrutura secundária que estariam presente no mRNA transcrito. O todo ou porções do DNA podem também ser sintetizados para alterar a composição de base para um mais preferível na célula hospedeira desejada. Métodos para sintetizar seqüências e trazer seqüências juntas são bem estabelecidas na literatura. Mutagênese *in vitro* e seleção, mutagênese direcionada ao sítio, ou outros métodos podem ser empregados para obter mutações de genes de dessaturase de ocorrência natural para produzir um polipeptídeo tendo atividade de dessaturase *in vivo* com parâmetros físicos e cinéticos mais desejáveis para funcionar na

célula hospedeira, tal como uma meia-vida mais longa ou uma taxa mais elevada de produção de um ácido graxo poliinsaturado desejado.

Uma vez que o polinucleotídeo codificando um polipeptídeo de dessaturase foi obtido, ele é colocado em um vetor capaz de replicação em uma célula hospedeira, ou é propagado *in vitro* por meio de técnicas tais como PCR ou PCR longa. Vetores de replicação podem incluir plasmídeos, fago, viroses, cosmídeos e similares. Vetores desejáveis incluem aqueles úteis para mutagênese do gene de interesse ou para expressão do gene de interesse em células hospedeiras. A técnica de PCR longa fez propagação *in vitro* de grandes construções possíveis, a fim de que modificações para o gene de interesse, tais como mutagênese ou adição de sinais de expressão, e propagação dos constructos resultantes podem ocorrer inteiramente *in vitro* sem o uso de um vetor de replicação ou uma célula hospedeira.

Para expressão de um polipeptídeo de dessaturase, regiões de terminação e iniciação transcricional e translacional funcionais são operavelmente ligadas ao polinucleotídeo codificando o polipeptídeo de dessaturase. A expressão da região de codificação de polipeptídeo pode ocorrer *in vitro* ou em uma célula hospedeira. As regiões de iniciação e terminação transcricionais e translacionais são derivadas de diversas fontes não exclusivas, incluindo o polinucleotídeo a ser expresso, genes conhecidos ou suspeitos de ser capazes de expressão no sistema desejado, vetores de expressão, síntese química, ou de um locus endógeno em uma célula hospedeira.

Expressão em uma célula hospedeira pode ser realizada em um estilo transitório ou estável. A expressão transitória pode ocorrer de construções introduzidas que contêm sinais de expressão funcionais na célula hospedeira, porém cujos constructos não replicam-se e raramente integram-se na célula hospedeira, ou onde a célula hospedeira não está proliferando-se. A expressão transitória também pode ser realizada induzindo-se a atividade de um promotor regulável operavelmente ligado ao gene de interesse, embora tais sistemas induzíveis freqüentemente exibam um nível basal baixo de expressão. A expressão estável pode ser obtida por introdução de um

constructo que pode integrar-se no genoma hospedeiro ou que replica-se autonomamente na célula hospedeira. A expressão estável do gene de interesse pode ser selecionada através do uso de um marcador selecionável localizado sobre ou transfectado com o constructo de expressão, seguido
5 pela seleção de células expressando o marcador. Quando a expressão estável resulta de integração, integração de constructos pode ocorrer aleatoriamente dentro do genoma hospedeiro ou pode ser alvejada através do uso de constructos contendo regiões de homologia com o genoma hospedeiro suficiente para alvejar recombinação com o locus hospedeiro. Onde constructos são alvejados para um locus endógeno, o todo ou algumas das regiões reguladoras transcricionais e translacionais podem ser fornecidas pelo locus endógeno.

Quando expressão aumentada do polipeptídeo de dessaturase no organismo fonte é desejada, diversos métodos podem ser empregados.
15 Genes adicionais codificando o polipeptídeo de dessaturase podem ser introduzidos no organismo hospedeiro. Expressão do locus de dessaturase nativo também pode ser aumentada através de recombinação homóloga, por exemplo inserindo-se um promotor mais forte no genoma hospedeiro para causar expressão aumentada, removendo seqüências de desestabilização ou do mRNA ou da proteína codificada deletando-se aquela informação do gene hospedeiro, ou adicionando-se seqüências de estabilização ao mRNA (Patente dos Estados Unidos nº 4.910.141).

É contemplado que mais do que um polinucleotídeo codificando uma dessaturase ou um polinucleotídeo codificando mais do que uma dessaturase possa ser introduzido e propagado em uma célula hospedeira através do uso de vetores de expressão epissômica ou integrada. Onde dois ou mais genes são expressos de vetores de replicação separados, é desejável que cada vetor tenha um método diferente de replicação. Cada constructo introduzido, se integrado ou não, deve ter um método diferente de seleção e
30 não deve ter homologia com os outros constructos para manter a expressão estável e prevenir reclassificação de elementos entre os constructos. Escolhas judiciosas de regiões reguladoras, métodos de seleção e método de

propagação do constructo introduzido podem ser experimentalmente determinados de modo que todos os polinucleotídeos introduzidos sejam expressos nos níveis necessários para prover a síntese dos produtos desejados.

Quando necessário para transformação, as seqüências de codificação de $\Delta 15$ -dessaturase da presente invenção podem ser inseridas em um vetor de transformação de planta, *por exemplo*, o vetor binário descrito por Bevan (1984). Os vetores de transformação de planta podem ser derivados por modificação do sistema de transferência de gene natural de *Agrobacterium tumefaciens*. O sistema natural compreende plasmídeos de (indução de tumor) Ti contendo um grande segmento, conhecido como T-DNA, que é transferido para plantas transformadas. Outro segmento do plasmídeo Ti, a região vir, é responsável pela transferência de T-DNA. A região T-DNA é delimitada por repetições terminais. Nos vetores binários modificados os genes de indução de tumor foram deletados e as funções da região vir são utilizadas para transferir o DNA estranho limitado pelas seqüências limítrofes de T-DNA. A região T também contém um marcador selecionável para resistência à asntibiótico, e um sítio de clonagem múltipla para inserção de seqüências para transferência. Tais linhagens construídas são conhecidas como linhagens de *A. tumefaciens* "desarmadas", e permitem a transformação eficiente de seqüências limitadas pela região T nos genomas nucleares de plantas.

A invenção objeto encontra muitas aplicações. As sondas com base nos polinucleotídeos da presente invenção podem encontrar uso em métodos para isolar moléculas relacionadas ou em métodos para detectar organismos expressando dessaturases. Quando empregados como sondas, os polinucleotídeos ou oligonucleotídeos devem ser detectáveis. Isto é usualmente realizado colando-se um rótulo ou em um sítio interno, por exemplo por meio de incorporação de um resíduo modificado, ou nas terminações 5' e 3'. Tais rótulos podem ser diretamente detectáveis, podem ligar-se a uma molécula secundária que é detectavelmente rotulada, ou podem ligar-se a uma molécula secundária não rotulada e uma molécula terciária detectavelmente rotulada; este processo pode ser estendido tanto quanto seja prático

para obter um sinal satisfatoriamente detectável sem níveis inaceitáveis de sinal de base. Os sistemas secundários, terciários ou em ponte podem incluir uso de anticorpos direcionados contra qualquer outra molécula, incluindo rótulos ou outros anticorpos, ou podem envolver quaisquer moléculas que ligam-se uma à outra, por exemplo, um sistema de biotina-estreptavidina/avidina. Rótulos detectáveis tipicamente incluem isótopos radioativos, moléculas que quimicamente ou enzimaticamente produzem ou alteram luz, enzimas que produzem produtos de reação detectáveis, moléculas magnéticas, moléculas fluorescentes ou moléculas cujas características de fluorescência ou emissão de luz alteram-se em ligação. Exemplos de métodos de rotulagem podem ser encontrados na Patente dos Estados Unidos nº 5.011.770. Alternativamente, a ligação de moléculas alvo pode ser diretamente detectada avaliando-se a alteração em calor de solução em ligação de sonda ao alvo por meio de calorimetria de titulação isotérmica, ou revestindo-se a sonda ou alvo sobre uma superfície e detectando-se a alteração em dispersão de luz da superfície produzida por ligação de alvo ou sonda, respectivamente, como pode ser feito com o sistema BIAcore.

Constructos compreendendo o gene de interesse podem ser introduzidas em uma célula hospedeira por técnicas padrão. Para conveniência, uma célula hospedeira que foi manipulada por qualquer método para apreender uma sequência ou constructo de DNA será referida como "transformada" ou "recombinante" aqui. O hospedeiro objeto terá pelo menos uma cópia da construção de expressão e pode ter duas ou mais, por exemplo dependendo de se o gene é integrado no genoma, amplificado, ou está presente em um elemento extracromossômico tendo números de cópia múltiplos.

A célula hospedeira transformada pode ser identificada por seleção para um marcador contido sobre o constructo introduzido. Alternativamente, um constructo marcador separado pode ser introduzido com o constructo desejado, como muitas técnicas de transformação introduzem muitas moléculas de DNA dentro das células hospedeiras. Tipicamente, hospedeiros transformados são selecionados por sua capacidade de desenvolver-se

sobre meios seletivos. Os meios seletivos podem incorporar um antibiótico ou não ter um fator necessário para o desenvolvimento do hospedeiro não transformado, tal como um nutriente ou fator de crescimento. Um gene marcador introduzido portanto pode conferir resistência antibiótica, ou codificar um fator de crescimento essencial ou enzima, e permitir o crescimento sobre meios seletivos quando expressos no hospedeiro transformado. Seleção de um hospedeiro transformado pode também ocorrer quando a proteína marcadora expressa pode ser detectada, ou direta ou indiretamente. A proteína marcadora pode ser expressa sozinha ou como uma fusão à outra proteína.

10 A proteína marcadora pode ser detectada por sua atividade enzimática; por exemplo, a beta-galactosidase pode converter o substrato X-gal em um produto colorido, e a luciferase pode converter luciferina em um produto de emissão de luz. A proteína marcadora pode ser detectada por suas características de produção ou modificação de luz; por exemplo, a proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria* fluoresce quando iluminada com luz azul.

15 Os anticorpos podem ser empregados para detectar a proteína marcadora ou um rótulo molecular sobre, por exemplo, uma proteína de interesse. Células expressando a proteína marcadora ou rótulo podem ser selecionadas, por exemplo, visualmente, ou por técnicas tais como FACS ou panículação empregando-se anticorpos. Desejavelmente, resistência à canamicina e ao amino glicosídeo G418 é de interesse, bem como a capacidade de desenvolver-se em meio de cultura sem uracila, leucina, lisina ou triptofano.

De particular interesse é a produção mediada por $\Delta 15$ -dessaturase de PUFA's em células hospedeiras eucarióticas. As células eucarióticas incluem células de planta, tais como aquelas de plantas de colheita de produção de óleo, e outras células receptíveis à manipulação genética incluindo células fúngicas. As células podem ser cultivadas ou formadas como parte ou o todo de um organismo hospedeiro incluindo uma planta. Em uma modalidade preferida, o hospedeiro é uma célula de planta que produz e/ou pode assimilar substrato(s) exogenamente supridos para uma $\Delta 15$ -dessaturase, e preferivelmente produz grandes quantidades de um ou mais dos substratos.

A célula hospedeira transformada é desenvolvida sob condições apropriadas adaptadas para um resultado final desejado. Para células hospedeiras desenvolvidas em cultura, as condições são tipicamente otimizadas para produzir a maior ou mais econômica produção de PUFA's, que refere-se à atividade de dessaturase selecionada. As condições dos meios de cultura que podem ser otimizadas incluem: fonte de carbono, fonte de nitrogênio, adição de substrato, concentração final de substrato adicionado, forma de substrato adicionado, crescimento aeróbico ou anaeróbico, temperatura de crescimento, agente de indução, temperatura de indução, fase de crescimento em indução, fase de crescimento em colheita, pH, densidade, e manutenção de seleção.

Outro aspecto da presente invenção fornece plantas transgênicas ou progênie de plantas contendo o DNA isolado da invenção. Ambas as plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas são contempladas. As células de planta são transformadas com um DNA isolado codificando $\Delta 15$ -dessaturase por qualquer dos métodos de transformação de planta acima descritos. A célula de planta transformada, usualmente em uma cultura de calo ou disco de folha, é regenerada em uma planta transgênica completa por métodos bem conhecidos por alguém versado na técnica (*por exemplo*, Horsch e outros, 1985). Em uma modalidade, a planta transgênica é selecionada do grupo consistindo em *Arabidopsis thaliana*, canola, milho de soja, soja, semente de colza, girassol, algodão, cacau, amendoim, açafrão, coco, linho, palma oleosa, semente oleosa de *Brassica napus*, milho, jojoba, árvore de sebo Chinesa, tabaco, plantas frutíferas, plantas cítricas ou plantas de produção de nozes e bagas. Uma vez que a progênie de plantas transformadas herda o polinucleotídeo codificando $\Delta 15$ -desaturase, sementes ou mudas de plantas transformadas podem ser empregadas para manter a linhagem de planta transgênica.

A presente invenção também provê um método para fornecer plantas transgênicas com um teor aumentado de ALA e/ou SDA. Este método inclui, por exemplo, introduzir DNA codificando $\Delta 15$ -dessaturase em células de planta que não têm ou têm níveis baixos de ALA ou SDA porém

contêm LA, e regenerar plantas com teor de ALA e/ou SDA aumentado das células transgênicas. Em certas modalidades da invenção, um DNA codificando uma $\Delta 6$ - e/ou $\Delta 12$ -dessaturase pode também ser introduzido nas células de planta. Tais plantas podem ou não podem também compreender

5 atividade de $\Delta 6$ - e/ou $\Delta 12$ -dessaturase endógena. Em certas modalidades, plantas de colheita comercialmente desenvolvida modificadas são contempladas como o organismo transgênico, incluindo, porém não limitadas a, *Arabidopsis thaliana*, canola, milho de soja, soja, semente de colza, girassol, algodão, cacau, amendoim, açafrão, coco, linho, palma oleosa, semente

10 oleosa de *Brassica napus*, milho, jojoba, árvore de sebo Chinesa, tabaco, plantas frutíferas, plantas cítricas ou plantas de produção de nozes e bagas.

A presente invenção também fornece um método para fornecer plantas transgênicas que podem conter níveis elevados de ALA e/ou SDA, onde os referidos níveis elevados são maiores do que os níveis encontrados

15 em plantas não transformadas. Este método pode compreender introduzir um ou mais polinucleotídeo codificando $\Delta 15$ -dessaturase em uma planta que não tem ou tem níveis baixos de ALA, porém contém LA. Vetores de expressão compreendendo DNA codificando uma $\Delta 15$ -dessaturase, ou uma $\Delta 15$ -dessaturase e uma $\Delta 6$ -dessaturase, podem ser construídos por métodos de tecnologia recombinante conhecidos por alguém versado na técnica

20 (Sambrook e outros, 1989). Em particular, plantas de colheita comercialmente desenvolvidas são contempladas como organismo transgênico, incluindo, porém não limitado a, *Arabidopsis thaliana*, canola, milho de soja, soja, semente de colza, girassol, algodão, cacau, amendoim, açafrão, coco,

25 linho, palma oleosa, semente oleosa de *Brassica napus*, e milho.

Para suplementação alimentar, os PUFAs purificados, plantas transformadas ou partes de planta, ou derivados destes, podem ser incorporados em óleos de cozimento, gorduras ou margarinas formuladas de modo que em uso normal o receptor receberia a quantidade desejada. Os PUFAs

30 podem também ser incorporados em fórmulas infantis, suplementos nutricionais ou outros produtos alimentícios, e podem encontrar uso como agentes anti-inflamatórios ou de redução de colesterol.

Como aqui empregado, "composição comestível" é definido como composições que podem ser ingeridas por um mamífero tal como gêneros alimentícios, substâncias nutricionais e composições farmacêuticas. Como aqui empregado "gêneros alimentícios" refere-se a substâncias que podem ser empregadas ou preparadas para uso como alimento para um mamífero e inclui substâncias que podem ser empregadas na preparação de alimento (tal como óleos de peixinhos) ou aditivos alimentícios. Por exemplo, gêneros alimentícios incluem animais empregados para consumo humano ou qualquer produto deles, tal como, por exemplo, ovos. Gêneros alimentícios típicos, porém não limitados a bebidas, (*por exemplo*, drinques leves, bebidas carbonadas, bebidas prontas para misturar), alimentos infundidos (*por exemplo* frutas e vegetais), molhos, condimentos, molhos de salada, sucos de fruta, xaropes, sobremesas (*por exemplo*, pudins, gelatina, glacê e recheios, mercadorias cozidas e sobremesas congeladas tais como sorvetes e sorvete de frutas), produtos congelados macios (*por exemplo*, cremes congelados macios, iogurtes e sorvetes congelados macios, sobremesas congeladas macias tais como sobremesas batidas de leite e não leite), óleos e produtos emulsificados (*por exemplo*, óleo para massa frágil, margarina, maionese, manteiga, óleo de cozimento, e molhos de salada) e alimentos de umidade intermediária (*por exemplo*, arroz e comidas para cães).

Além disso, composições comestíveis aqui descritas podem também ser ingeridas como um aditivo ou suplemento contido em alimentos e drinques. Estas podem ser formuladas juntamente com uma substância nutricional tal como várias vitaminas e minerais e incorporadas em composições substancialmente líquidas tais como drinques de nutrientes, leites de soja e sopas; composições substancialmente sólidas; e gelatinas ou empregadas na forma de um pó a ser incorporado em vários alimentos. O teor do ingrediente eficaz em um tal alimento funcional ou saudável pode ser similar à dose contida em um agente farmacêutico típico.

Os PUFAs purificados, plantas transformadas ou partes de planta podem também ser incorporados em alimentação animal, particularmente gado. Deste modo, os próprios animais podem beneficiar-se de uma

dieta rica em PUFA, ao mesmo tempo que os consumidores humanos de produtos alimentícios produzidos de tais gados podem beneficiar-se também. É esperado em certas modalidades que o SDA seja convertido em EPA em animais e desse modo tais animais podem beneficiar-se de um aumento em EPA por consumo de SDA.

Para uso farmacêutico (humano ou veterinário), as composições podem geralmente ser administradas oralmente, porém podem ser administradas por qualquer rotina pela qual elas podem ser bem-sucedidamente absorvidas, *por exemplo*, parenteral (*isto é*, subcutânea, intramuscular ou intravenosamente), retal, vaginal ou topicamente, por exemplo, como uma loção ou unguento para a pele. As plantas transformadas de PUFA's ou partes de planta da presente invenção podem ser administradas sozinhas ou em combinação com a portador ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Onde disponível, cápsulas de gelatina são a forma preferida de administração oral. Suplementação alimentícia como acima mencionado pode também fornecer uma rotina oral de administração. Os ácidos insaturados da presente invenção podem ser administrados em formas conjugadas, ou como sais, ésteres, amidas ou pró-drogas dos ácidos graxos. Qualquer sal farmacêuticamente aceitável é abrangido pela presente invenção; especialmente preferidos são os sais de sódio, potássio ou lítio. Também abrangidos são os sais de N-alquilpolihidroxamina, tais como glucamina de N-metila, encontrado na publicação PCT WO 96/33155. Os ésteres preferidos são os ésteres de etila. Como sais sólidos, os PUFA's também podem ser administrados em forma de comprimido. Para administração intravenosa, os PUFA's ou derivados destes podem ser incorporados em formulações comerciais tais como Intralipídeos.

Se desejado, as regiões de um polipeptídeo de dessaturase importante para a atividade de dessaturase podem ser determinadas através de mutagênese de rotina seguida por expressão dos polipeptídeos mutantes resultantes e determinação de suas atividades. Os mutantes podem incluir substituições, deleções, inserções e mutações de ponto, ou combinações destes. As substituições podem ser feitas com base na hidrofobicidade e

hidrofilicidade conservada (Kyte e Doolittle, 1982), ou com base na capacidade de assumir estrutura secundária de polipeptídeo similar (Chou e Fasman, 1978). Uma análise funcional típica começa com mutagênese de deleção para determinar os limites de terminal N e C da proteína necessária para funcionar, e então deleções internas, inserções ou mutantes de ponto são feitos para também determinar regiões necessárias para funcionar. Outras técnicas tais como mutagênese de cassete ou síntese total também podem ser empregadas. Mutagênese de deleção é realizada, por exemplo, empregando-se exonucleases para seqüencialmente remover as regiões de codificação 5' ou 3'. *Kits* estão disponíveis para tais técnicas. Após a deleção, a região de codificação é completada ligando-se oligonucleotídeos contendo códons de partida ou interrupção à região de codificação deletada após deleção de 5' ou 3', respectivamente. Alternativamente, os oligonucleotídeos codificando códons de partida ou interrupção são inseridos na região de codificação por diversos métodos incluindo mutagênese direcionada ao sítio, PCR mutagênica, ou por ligação sobre o DNA digerido em sítios de restrição existentes.

Deleções internas podem similarmente ser feitas através de uma variedade de métodos incluindo o uso de sítios de restrição existentes no DNA, pelo uso de iniciadores mutagênicos por meio de mutagênese direcionada ao sítio ou PCR mutagênica. Inserções são feitas através de métodos tais como mutagênese de varredura de ligador, mutagênese direcionada ao sítio ou PCR mutagênico. Mutações de ponto são feitas através de técnicas tais como mutagênese direcionada ao sítio ou PCR mutagênica. Mutagênese química pode também ser empregada para identificar regiões de um polipeptídeo de dessaturase importante para atividade. Tal análise de função-estrutura pode determinar quais regiões podem ser deletadas, quais regiões toleram inserções, e quais mutações de ponto permitem a proteína mutante funcionar substancialmente da mesma maneira como a dessaturase nativa. Todas as tais proteínas mutantes e seqüências de nucleotídeo codificando-as incluem-se no escopo da presente invenção.

Como acima descrito, certas modalidades da presente invenção

concernem constructos de transformação de planta. Por exemplo, um aspecto da presente invenção é um vetor de transformação de planta compreendendo um ou mais gene(s) de dessaturase ou cDNA(s). Sequências de codificação exemplares para uso com a invenção incluem a $\Delta 15$ -dessaturase NcD15D de gene de *Neurospora crassa* (SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2) e $\Delta 15$ -dessaturase AnD15D de *Aspergillus nidulans* (SEQ ID NO:4). Em certas modalidades, sequências de dessaturase anti-sentido podem também ser empregadas com a invenção. Ácidos nucleicos codificando dessaturase exemplares incluem pelo menos 20, 40, 80, 120, 300 e até o tamanho natural das sequências de ácido nucleico de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO:33 podem ser empregados. Em certos aspectos, um ácido nucleico pode codificar 1, 2, 3, 4, ou mais enzimas de dessaturase. Em modalidades particulares, um ácido nucleico pode codificar uma $\Delta 6$ - e $\Delta 15$ -dessaturase.

Em certas modalidades da invenção, sequências de codificação são fornecidas operavelmente ligadas a um promotor heterólogo, em orientação de sentido ou anti-sentido. Constructos de expressão são também fornecidos compreendendo estas sequências, como são plantas e células de planta transformadas com as sequências. A construção de constructos que podem ser empregados em conjunto com técnicas de transformação de planta empregando-se estas ou outras sequências de acordo com a invenção serão conhecidas por aqueles versados na técnica à luz da presente descrição (veja, por exemplo, Sambrook e outros, 1989; Gelvin e outros, 1990). As técnicas da presente invenção são desse modo não limitadas a quaisquer sequências de ácido nucleico particulares.

Um uso das sequências fornecidas pela invenção será na alteração de fenótipos de planta, por exemplo, composição de óleo, por transformação genética com genes de dessaturase, em modalidades particulares uma $\Delta 15$ -dessaturase fúngica. O gene de dessaturase pode ser fornecido com outras sequências. Onde uma região de codificação expressível que não é necessariamente uma região de codificação de marcador é empregada em combinação com uma região de codificação de marcador, alguém

pode empregar as regiões de codificação separada no mesmo ou diferentes segmentos de DNA para transformação. No último caso, os vetores diferentes são liberados concomitantemente para as células receptoras para maximizar a co-transformação.

- 5 A escolha de quaisquer elementos adicionais empregados em conjunto com as seqüências de codificação de dessaturase freqüentemente dependerá do propósito da transformação. Um dos principais propósitos de transformação de plantas de colheita é adicionar características agronomicamente importantes, comercialmente desejáveis à planta. Como PUFAs
10 são conhecidos para conferir muitos efeitos benéficos sobre a saúde, aumentos concomitantes em produção de SDA podem também ser benéficos e poderiam ser obtidos pela expressão de $\Delta 15$ -dessaturase fúngica. Tal aumento de SDA pode, em certas modalidades da invenção, compreender expressão de $\Delta 6$ e/ou $\Delta 12$ dessaturase, incluindo $\Delta 6$ e/ou $\Delta 12$ dessaturases
15 fúngica ou de planta.

- Vetores empregados para transformação de planta podem incluir, por exemplo, plasmídeos, cosmídeos, YACs (cromossomas artificiais de levedura), BACs (cromossomas artificiais bacterianos) ou qualquer outro sistema de clonagem adequado, bem como fragmentos de DNA deles. Des-
20 se modo quando o termo "vetor" ou "vetor de expressão" é empregado, todos os tipos anteriores de vetores, bem como seqüências de ácido nucléico isoladas deles, são incluídos. É contemplado que a utilização de sistemas de clonagem com grandes capacidades de inserção permitam a introdução de grandes seqüências de DNA compreendendo mais do que um gene selecionado. De acordo com a invenção, isto poderia ser empregado para in-
25 troduzir vários ácidos nucléicos codificando dessaturase. A introdução de tais seqüências pode ser facilitada pelo uso de cromossomas artificiais de levedura ou bacterianos (BACs ou YACs, respectivamente), ou ainda cromossomas artificiais de planta. Por exemplo, o uso de BACs para a trans-
30 formação mediada por Agrobactéria foi descrito por Hamilton e outros (1996).

Particularmente úteis para transformação são os cassetes de

expressão que foram isolados de tais vetores. Os segmentos de DNA empregados para transformar células de planta, evidentemente, geralmente compreenderão o CDNA, gene ou genes que alguém deseja introduzir dentro e ter expressos nas células hospedeiras. Estes segmentos de DNA podem também incluir estruturas tais como promotores, realçadores, poliligantes, ou ainda genes reguladores como desejado. O segmento de DNA ou gene escolhidos para introdução celular freqüentemente codificam uma proteína que será expressa nas células recombinantes resultantes resultando em uma característica analisável ou selecionável e/ou que conferirá um fenótipo melhorado à planta transgênica resultante. Entretanto, este pode não ser sempre o caso, e a presente invenção também abrange plantas transgênicas incorporando transgenes não expressos. Os componentes preferidos prováveis de serem incluídos com vetores empregados na presente invenção são como segue.

Em uma modalidade, a presente invenção utiliza certos promotores. Exemplos de tais promotores que podem ser empregados com a presente invenção incluem, porém não estão limitados ao 35S CaMV (vírus mosaico da couve-flor), 34S FMV (vírus mosaico da escrofulária) (veja, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos nº 5.378.619, o teor da qual é aqui incorporado em sua totalidade), *Napin* (de Brassica), 7S (de soja), Glob e Lec (de milho). O promotor e promotores de 35S CaMV, que são regulados durante a maturação de semente de planta, são de particular interesse para uso com a presente invenção. Todos os tais promotores e elementos reguladores transcricionais, simplesmente ou em combinação, são contemplados para uso nos presentes vetores de expressão replicáveis e são conhecidos por alguém versado na técnica.

O promotor CaMV 35S é descrito, por exemplo, por Restrepo e outros (1990). Sequências reguladoras geneticamente transformadas e mutadas que induzem à expressão específica da semente podem também ser empregadas para a produção de composição de óleo de semente modificada. Tais modificações da invenção descritas aqui serão óbvias para alguém versado na técnica.

A seqüência de DNA entre o sítio de iniciação de transcrição e o início da seqüência de codificação, isto é, a seqüência líder não traduzida, pode também influenciar a expressão de gene. Alguém pode desse modo desejar empregar uma seqüência líder particular com um constructo de transformação da invenção. As seqüências líderes preferidas são contempladas por incluir aquelas que compreendem seqüências preditas direcionarem expressão ideal do gene atado, isto é, incluem uma seqüência líder de consenso preferida que pode aumentar ou manter a estabilidade de mRNA e previnem a iniciação imprópria de tradução. A escolha de tais seqüências será conhecida por aqueles versados na técnica na luz da presente descrição. Seqüências que são derivadas de genes que são altamente expressos em plantas tipicamente serão preferidas.

Constructos de transformação preparados de acordo com a invenção tipicamente incluirão uma seqüência de DNA de terminação 3' que atua como um sinal para terminar transcrição e provê a subsistência de poliadenilação do mRNA produzido por seqüências de codificação operavelmente ligadas a um gene de dessaturase (por exemplo, CDNA). Em uma modalidade da invenção, o terminador nativo de um gene de dessaturase é empregado. Alternativamente, uma terminação de 3' heteróloga pode realçar a expressão de regiões de codificação de dessaturase. Exemplos de terminadores supostos serem úteis incluem aqueles do gene de sintase de nopalina de *Agrobacterium tumefaciens* (terminação nos 3') (Bevan e outros, 1983), o terminador para a transcrição de T7 do gene de sintase de octopina de *Agrobacterium tumefaciens*, a terminação 3' dos genes de inibidor I ou II de protease de batata ou tomate e o terminador 35S de CaMV (tm13'). Os elementos reguladores tais como um íntron Adh (Callis e outros, 1987), íntron de sintase de sacarose (Vasil e outros, 1989) ou elemento ômega de TMV (Gallie e outros, 1989), podem também ser incluídos onde desejado.

Empregando-se uma proteína marcadora selecionável ou analisável, alguém pode fornecer ou realçar a capacidade de identificar transformantes. "Genes marcadores" são genes que conferem um fenótipo distinto às células expressando a proteína marcadora e desse modo permitem tais

células transformadas serem distinguidas de células que não têm o marcador. Tais genes podem codificar ou um marcador selecionável ou analisável, dependendo de se o marcador confere uma característica que alguém pode "selecionar" por métodos químicos, isto é, através do uso de um agente se-
5 letivo (por exemplo, herbicida, antibiótico, ou similares), ou se é simplesmente uma característica que alguém pode identificar através de observação ou teste, isto é, por "análise" (por exemplo, uma proteína fluorescente verde). Evidentemente, muitos exemplos de proteínas marcadoras adequadas são conhecidos na técnica e podem ser empregados na prática da in-
10 venção.

Métodos adequados para a transformação de planta ou outras células para uso com a presente invenção são acreditados por incluir virtualmente qualquer método pelo qual o DNA pode ser introduzido em uma célula, tal como por liberação direta de DNA tal como por transformação
15 mediada por PEG de protoplastos (Omirulleh e *outros*, 1993), por captação de DNA mediada por dessecação/inibição (Potrykus e *outros*, 1985), por eletroporação (Patente dos Estados Unidos nº 5.384.253, especificamente incorporada aqui por referência em sua totalidade), por agitação com fibras de carbureto de silício (Kaepler e *outros*, 1990; Patente dos Estados Uni-
20 dos nº 5.302.523, especificamente aqui incorporada por referência em sua totalidade; e Patente dos Estados Unidos nº 5.464.765, especificamente aqui incorporada por referência em sua totalidade), por transformação mediada por *Agrobacterium* (Patente dos Estados Unidos nº 5.591.616 e Patente dos Estados Unidos nº 5.563.055; ambas especificamente aqui incorporadas
25 por referência) e por aceleração de partículas revestidas por DNA (Patente dos Estados Unidos nº 5.550.318; Patente dos Estados Unidos nº 5.538.877; e Patente dos Estados Unidos nº 5.538.880; cada qual especificamente aqui incorporada por referência em sua totalidade), etc. Através da aplicação de técnicas tais como estas, as células de virtualmente qualquer
30 espécie de planta podem ser estavelmente transformadas, e estas células desenvolveram-se em plantas transgênicas.

Após realizar a liberação de DNA exógeno para as células re-

ceptoras, as etapas seguintes geralmente envolvem identificar as células transformadas para outra cultura e regeneração de planta. A fim de melhorar a capacidade de identificar transformantes, alguém pode desejar empregar um gene marcador selecionável ou analisável com um vetor de transformação preparado de acordo com a invenção. Neste caso, alguém então geralmente ensaiaria a população de célula potencialmente transformada expondo-se as células a um agente ou agentes seletivo(s), ou alguém analisaria células quanto à característica de gene marcador desejada.

Células que sobrevivem à exposição ao agente seletivo, ou células que foram classificadas positivas em um ensaio de avaliação, podem ser cultivadas em meios de cultura que suportam regeneração de plantas. Em uma modalidade exemplar, meios de cultura de MS e N6 podem ser modificados incluindo-se outras substâncias tais como reguladores de crescimento. Um tal regulador de crescimento é dicamba ou 2,4-D. Entretanto, outros reguladores de crescimento podem ser empregados, incluindo NAA, NAA + 2,4-D ou picloram. O desenvolvimento de meios de cultura desta e de maneiras similares foi descoberto facilitar o crescimento de células em estágios desenvolvidos específicos. O tecido pode ser mantido sobre um meio de cultura básico com reguladores de crescimento até tecido suficiente estar disponível para começar os esforços de regeneração de planta, ou seguindo os ciclos repetidos de seleção manual, até a morfologia do tecido estar adequada para a regeneração tipicamente pelo menos 2 semanas, em seguida transferido para meio de cultura conducente para manutenção de embrióides. As culturas são transferidas a cada 2 semanas sobre este meio de cultura. O desenvolvimento de broto sinalizará o tempo para transferir para o meio de cultura sem reguladores de crescimento.

Para confirmar a presença do DNA exógeno ou "transgene(s)" nas plantas regeneradas, diversos ensaios podem ser realizados. Tais ensaios incluem, por exemplo, ensaios "biológicos moleculares", tais como blotting e PCR®; ensaios "bioquímicos", tais como detecção da presença de um produto de proteína, por exemplo, por métodos imunológicos (ELISAs e Western blot), ou por função enzimática; ensaios de parte de planta, tais

como ensaios de folha e raiz; e também, por análise do fenótipo da planta inteira regenerada.

Em adição à transformação direta de um genótipo de planta particular com um constructo preparado de acordo com a presente invenção.

- 5 Plantas transgênicas podem ser feitas cruzando-se uma planta tendo um DNA selecionado da invenção, com uma segunda planta sem o DNA. As técnicas de reprodução de planta podem também ser empregadas para introduzir uma dessaturase múltipla, por exemplo, $\Delta 6$, $\Delta 12$ e/ou $\Delta 15$ -dessaturase(s) em uma única planta. Deste modo, a $\Delta 15$ -dessaturase pode
- 10 ser eficazmente super-regulada. Criando-se plantas homozigotas para uma atividade de $\Delta 25$ -dessaturase e/ou outra atividade de dessaturase (por exemplo, atividade de $\Delta 6$ - e/ou $\Delta 12$ -dessaturase) metabólitos benéficos podem ser aumentados na planta.

- Como acima mencionado, um gene de dessaturase selecionado
- 15 pode ser introduzido em uma variedade de planta particular por cruzamento, sem a necessidade de sempre diretamente transformar uma planta daquela variedade determinada. Portanto, a presente invenção não abrange apenas uma planta diretamente transformada ou regenerada de células que foram transformadas de acordo com a presente invenção, porém também a pro-
- 20 gênie de tais plantas. Como aqui empregado o termo "progênie" denota a descendência de qualquer geração de uma planta origem preparada de acordo com a presente invenção, onde a progênie compreende um constructo de DNA selecionado de acordo com a invenção. "Cruzar" uma planta para fornecer uma linhagem de planta tendo um ou mais transgenes ou
- 25 alelos adicionados com relação a uma linhagem de planta de partida, como aqui descrito, é definido como técnicas que resultam em uma seqüência particular sendo introduzida em uma linhagem de planta por cruzamento de uma linhagem de partida com uma linhagem de planta doadora que compreende um transgene ou alelo da invenção. Para obter isto alguém poderia,
- 30 por exemplo, realizar as seguintes etapas: (a) sementes de planta da primeira (linhagem de partida) e segunda (linhagem de planta doadora que compreende um transgene ou alelo desejado) plantas origem; (b) desenvolver

as sementes das primeira e segunda plantas origem em plantas que transportam flores; (c) polinar uma flor da primeira planta origem com o pólen da segunda planta origem; e (d) colher sementes produzidas da planta oriem transportando a flor fertilizada.

5 Recruzamento é aqui definido como o processo incluindo as etapas de: (a) cruzar uma planta de um primeiro genótipo contendo um gene desejado, elemento ou seqüência de DNA com uma planta de um segundo genótipo sem o referido gene desejado, elemento ou seqüência de DNA; (b) selecionar uma ou mais plantas de progênie contendo o gene desejado,
10 elemento ou seqüência de DNA; (c) cruzar a planta de progênie com uma planta do segundo genótipo; e (d) repetir as etapas (b) e (c) para o propósito de transferir uma seqüência de DNA desejada de uma planta de um primeiro genótipo para uma planta de um segundo genótipo.

 Introgressão de um elemento de DNA em um genótipo de planta
15 é definida como o resultado do processo de conversão de recruzamento. Um genótipo de planta no qual uma seqüência de DNA foi introgridida pode ser referido como um genótipo convertido de recruzamento, linhagem, congênito, ou híbrido. Similarmente um genótipo de planta sem a seqüência de DNA desejada pode ser referido como um genótipo não convertido, linha-
20 gem, congênito ou híbrido.

EXEMPLOS

 Os seguintes exemplos são incluídos para ilustrar modalidades da invenção. Deve ser apreciado por aqueles versados na técnica que as técnicas descritas nos exemplos que seguem representem técnicas descri-
25 tas pelo inventor para funcionar bem na prática da invenção. Entretanto, aqueles versados na técnica devem, à luz da presente descrição, apreciar que muitas alterações possam ser feitas nas modalidades específicas que são descritas e também obtêm um resultado igual ou similar sem afastar-se do conceito, espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, será evi-
30 dente que certos agentes que estão igual química e fisiologicamente relacionados podem ser substituídos pelos agentes aqui descritos ao mesmo tempo que resultados iguais ou similares sejam obtidos. Todos os tais subs-

tituintes similares e modificações evidentes para aqueles versados na técnica são supostos incluírem-se no espírito, escopo e conceito da invenção como definido pelas reivindicações anexas.

Exemplo 1

5 Cepas e Condições de Crescimento

O casamento de *Neurospora crassa* tipo A e *Aspergillus nidulans* Glasgow tipo silvestre foi obtido pelo Fungal Genetics Stock Center. Culturas foram desenvolvidas em meio de cultura N. de Vogel (Case e outros, *Neurospora Newsletter*, 8:25-26, 1965). Culturas líquidas foram inocu-
10 ladas com ascósporos e desenvolvidas durante três dias a 15°C com agitação a 100 RPM. O micélio foi colhido por filtração em um funil Buchner através de papel número 1 e estocado a 80°C para isolamento de RNA ou diretamente liofilizado para determinação da composição de ácido graxo por cromatografia de gás. A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* empregada foi
15 INVSc1, uma linhagem diplóide que é auxotrófica para histidina, leucina, triptofano e uracila (Invitrogen). Células foram mantidas em meio de cultura YPD a 30°C.

Exemplo 2

Isolamento de RNA Fúngico

20 O RNA total foi isolado de micélio fúngico das 3 linhagens descritas no Exemplo 1 empregando-se o método de ácido guanidínio-fenol-clorofórmio de Chomczynski e Sacchi, (1987, Tri-Reagent, SIGMA). Este método fornece 500 mg de micélio sendo moído em nitrogênio líquido, em seguida adicionado a 7 ml de Tri-Reagente. Clorofórmio foi adicionado para
25 separar a fase aquosa das fase orgânica. O RNA foi precipitado com isopropanol, em seguida lavado com 70% de etanol antes de ser ressuspense em água desionizada.

Exemplo 3

Clonagem das Sequências de $\Delta 12$ e $\Delta 15$ -Dessaturase de *N. crassa*.

30 Com base nas comparações de sequência às sequências genômicas de *N. crassa*, os iniciadores específicos de gene foram designados para amplificar as regiões de codificação de tamanho natural da $\Delta 12$ -

dessaturase putativa (Nc111F2 e Nc111R3) e a $\Delta 15$ -dessaturase putativa (Nc94F6 e Nc94R8). Os iniciadores dianteiros foram designados por incluir três nucleotídeos 5' do sítio Met de partida

Nc111F2: 5'-AAGATGGCGTCCGTCTCCTCTGCCCTTCCC-3' (SEQ ID NO:15)

Nc111R3: 5'-TTAGTTGGTTTTGGGGAGCTTGGCAGGCTTG-3' (SEQ ID NO:16)

Nc94F6: 5'-GCGGCCGCAACATGACGGTCACCAACCGCAGCCA-3' (SEQ ID NO:17). O sítio *NotI* adicionado à terminação 5' do oligonucleotídeo é italicizado.

Nc94R8: 5'-CCTGCAGGTTACTGGGTGCTCTGAACGGTGTGCG-3' (SEQ ID NO:18). O sítio *Sse8387I* adicionado à terminação 5' do oligonucleotídeo é italicizado.

O cDNA para *N. crassa* foi preparado empregando-se o *Kit* Marathon cDNA Amplification (Clontech Laboratories). Estes iniciadores foram empregados com CDNA preparado por 3'-RACE para amplificar as dessaturases putativas empregando-se um Gene Amp PCR system 9700 (PE Applied Biosystems) com as condições de ciclo recomendadas. O produto de PCR gerado com os oligonucleotídeos Nc94F6 e Nc94R8 foi ligado dentro do pCR2.1-TOPO (Invitrogen) e denominado pMON67004 (FIG. 1). O CDNA foi seqüenciado e três "caixas-His", um aspecto conservado entre dessaturases ligadas por membrana, foram descobertas por estar presentes nas posições de aminoácido 124-128, 160-164, e 359-363.

Quando comparado a outras $\Delta 12$ e $\Delta 15$ -dessaturases ligadas à membrana, o *motivo* de caixa de histidina "HXXHH" foi descoberto ser intacto também. As seqüências de nucleotídeo e polipeptídeo correspondentes para a $\Delta 15$ -dessaturase (NcD15D) são dadas na SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:3, respectivamente, e o clone genômico é dado na SEQ ID NO:1. pMON67004 foi digerido com o *EcoR1* e ligado no sítio de *EcoR1* do vetor de expressão de levedura pYES2/CT para gerar pMON77208 (FIG. 2). Para os vetores de transformação de planta, pMON67004 foi digerido com *EcoRI*, seguido por uma reação *fill-in*, e então cortados por *Sse8387I*. O fragmento

de gene foi ligado no vetor binário, pMON73270, que foi digerido por NotI, seguido por uma reação *fill-in*, e em seguida por Sse8387I. Isto deu origem ao vetor pMON77214 (FIG. 4) no qual o gene de $\Delta 15$ -dessaturase gene, NcD15D, era de sub-regulação do promotor Napin específico de semente. O
5 fragmento de DNA digerido por EcoRI/Sse8387I foi também ligado no vetor binário, pMON73273, dando origem ao pMON77217 (FIG. 4), no qual NcD15D foi de sub-regulação do promotor 35S constitutivo.

O produto de PCR gerado com oligonucleotídeos Nc111F2 e Nc111R3 foi ligado diretamente em pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) para
10 gerar pMON67005 (FIG.7A). O CDNA foi seqüenciado e três "caixas-His" foram descobertas por estar presentes em posições de aminoácido 158-162, 194-198, e 394-398. Quando comparado a outras $\Delta 12$ and $\Delta 15$ -dessaturases ligadas à membrana, o *motivo* de caixa de histidina "HXXHH" final foi descoberto ser intacto também. As seqüências de nucleotídeo e po-
15 lipeptídeo correspondentes para a $\Delta 12$ -dessaturase putativa (NcD12D) são fornecidas na SEQ ID NO:39 e SEQ ID NO:40, respectivamente.

Exemplo 4

Transformação e Expressão de Levedura.

Constructos pMON67005 e pMON77208 foram introduzidas na
20 cepa hospedeira *S. cerevisiae* INVSc1 (auxotrófica para uracila) empregando-se o protocolo PEG/Li Ac como descrito no manual para pYES2.1/V5-His-TOPO. Os transformantes foram selecionados sobre placas feitas de meios de cultura mínimos SC menos uracilas com 2% de glicose. Colônias de transformantes foram empregadas para inocular 5 ml de meios de cultura
25 mínimos SC menos uracila e 2% de glicose desenvolvidos durante a noite as 30°C. Para indução, as células de levedura de fase estacionária foram péletizada e ressuspensas em meios de cultura mínimos SC menos uracila suplementados com 2% de galactose e desenvolvidos durante 3 dias a 15°C. Quando ácidos graxos exógenos foram fornecidos para as culturas,
30 0.01% de LA ($\Delta 9,12-18:2$) foi adicionado com o emulsificante Tergitol a 0,1%. As culturas foram desenvolvidas durante 3 dias a 15°C, e subseqüentemente colhidas por centrifugação. Os péletes celulares foram lavados

uma vez com tampão de TE estéril, pH 7,5, para remover os meios de cultura, e liofilizadas durante 24 horas. A linhagem hospedeira transformada com o vetor contendo o gene LacZ foi empregado como um controle negativo em todas as experiências.

- 5 Para análise de ácido graxo, a extração dos lipídeos de levedura seguiu os procedimentos previamente descritos. Em síntese, os péletes de levedura liofilizados foram extraídos com 15 ml de metanol e 30 ml de clorofórmio contendo 100 µg de tridecanoína. Após extração, os lipídeos de levedura foram primeiro saponificados, e os ácidos graxos liberados foram
- 10 metilados. A distribuição de ésteres de metila de ácido graxo foi então analisada por cromatografia de gás (GC) empregando-se um cromatógrafo de gás 5890 II Plus da Hewlett-Packard (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) equipado com um detector de ionização de chama e uma coluna capilar de sílica fundida (Supelcomega; 50 m x 0,25 mm, i.d., Supelco, Bellefonte, PA).
- 15 Em levedura transformada com o vetor de expressão contendo LacZ como um controle, nenhum LA ou ALA (18:3) foi medido em linhagens desenvolvidas na ausência de LA adicionado. Em levedura transformada com um vetor de expressão contendo NcD15D ou BnD15D, na ausência de LA adicionado, nenhum ALA acumulado. Em levedura transformada com um
- 20 vetor de expressão contendo NcD12D, sem LA adicionado, LA acumulado para 22% dos ácidos graxos, indicativo de atividade D12D. Quando LA foi adicionado à linhagem de levedura expressando NcD15D, ALA comprometeu 1% dos ácidos graxos. Na linhagem de levedura expressando o *Brassica napus* Δ15-dessaturase (BnD15D), ALA comprometeu 0,2% dos ácidos gra-
- 25 xos após a adição de LA. No controle de LacZ, nenhum ALA foi detectado após a adição de LA.

TABELA 1. Dados de Expressão de Levedura.

Construção	Identi- dade	Substrto de FA Adicio- nado	% de Ácidos Graxos em Levedura					
			16:0 %	16:1 %	18:0 %	18:1 %	18:2 %	18:3 %
pMON77208	NcD15D	nenhum	13,96	48,33	5,06	29,07	0,02	0,02
pMON67003	BnD15D	nenhum	13,22	48,15	5,18	29,82	0,00	0,00
PMON67005	NcD12D	nenhum	15,24	47,95	5,18	10,3	22,3	0
LacZ	LacZ	nenhum	14,01	49,61	5,27	27,29	0,02	0,01
pMON77208	NcD15D	18:2	18,34	25,98	5,94	16,09	30,30	1,04
pMON67003	BnD15D	18:2	18,45	26,19	5,91	16,26	30,61	0,20
LacZ	LacZ	18:2	19,26	18,87	6,00	10,82	42,47	0,01

Exemplo 5**Transformação de *Arabidopsis* com NcD15D**

- Este exemplo descreve a transformação e regeneração de plantas *Arabidopsis thaliana* transgênicas expressando uma sequência de codificação de $\Delta 15$ -dessaturases heteróloga. Plantas de *Arabidopsis* foram desenvolvidas por semeadura de sementes em potes de 10,16 cm contendo água de osmose reversa (ROW) e MetroMix 200 saturado (The SCOTTS Co., Columbus, OH). As plantas foram vernalizadas colocando-se os potes em um plano, cobertos com um domo de umidade, em uma câmara de desenvolvimento a 4-7°C, 8 horas de luz/dia durante 4-7 dias. Os planos foram transferidos para uma câmara de desenvolvimento a 22°C, 55% de umidade relativa, e 16 horas de luz/dia em uma intensidade média de 160-200 $\sim$ Mol/s*m². Após germinação, o domo foi levantado e deslizado para trás 1" para prover circulação de ar suave sem dessecação. O domo de umidade foi removido quando as folhas reais formaram-se. As plantas foram aguadas na base, como necessário, com ROW até 2-3 semanas após germinação. As plantas foram então aguadas na base, como necessário, com solução PLANTEX 18-18-15 (Plantex Corporation Ottawa, Canadá) a 50 ppm de N₂.
- Os potes foram reduzidos de modo que 1 planta permaneceu por pote a 2-3 semanas após a germinação. Uma vez que as plantas começaram a brotar,

a inflorescência primária foi podada para encorajar o crescimento de brotos auxiliares.

Os vetores de transformação pMON77214 e pMON77217 foram introduzidos em linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* ABI empregando-se metodologia bem conhecida na técnica. As plantas de *A. thaliana* transgênicas foram obtidas como descrito por Bent *et al.* (1994) ou Bechtold e outros (1993). Em síntese, culturas de *Agrobacterium* contendo vetores binários pMPON77214 ou pMON77217, foram desenvolvidas durante a noite em LB (10% de bacto-triptona, 5% de extrato de levedura, e 10% de NaCl com canamicina (75 mg/L), cloranfenicol (25 mg/L), e espectinomicina (100 mg/L)). A cultura bacteriana foi centrifugada e ressuspensa em 5% de sacarose +0,05% de Silwet-77. A porção aérea de plantas *A. thaliana* inteiras (~ 5 - 7 semanas de idade) foi imersa na solução resultante durante 2 a 3 segundos. O excesso de solução foi removido secando-se as plantas sobre toalhas de papel. As plantas mergulhadas foram colocadas sobre seu lado em plano coberto e transferidas para uma câmara de crescimento a 19°C. Após 16 a 24 horas o domo foi removido e as plantas foram fixadas verticalmente. Quando as plantas atingiram a maturidade, a água foi retida durante 2 a 7 dias antes da colheita da semente. A semente colhida foi passada através de uma peneira de malha de aço inoxidável.

Para selecionar transformantes, a semente foi semeada sobre meio de cultura de ágar contendo 50 mg/L de glifosato. As mudas verdes foram resgatadas e transplantadas em potes de 10,16 cm e desenvolvidas sob as condições acima descritas. As folhas foram colhidas para análise de ácido graxo quando a roseta estava no estágio de 4 folhas. Após a liofilização, os ácidos graxos de folha foram analisados como acima descrito.

Exemplo 6

Expressão Funcional de Clones de *N. crassa*

A fim de avaliar a especificidade funcional do clone de *N. crassa* D15D, a região de codificação de pMON67004 foi clonada em um vetor de expressão de planta no qual o promotor 35S constitutivo direciona da expressão do transgene. A construção resultante, pMON77217, foi transfor-

5 mada em *A. thaliana* e as folhas de plantas T2 transformadas foram analisadas quanto à composição de ácido graxo. Em linhagens não transformadas, aproximadamente 20% dos ácidos graxos eram LA, e aproximadamente 48% de ALA. Em dois eventos de transformação de *A. thaliana* independentes, os níveis de LA foram reduzidos para aproximadamente 3% e 5%, e os níveis de ALA aumentaram para 65% e 63%, respectivamente, indicando a atividade de $\Delta 15$ -dessaturase em planta. Estes dados são sumarizados na Tabela 2. Os controles são designados como CONT.

TABELA 2 Teor de ácido graxo de Folhas de *Arabidopsis*

EVENTO	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2 (LA)	18:3(ALA)
CONT 1	14,9	0,8	1,4	4,8	19,7	48,2
CONT 2	15,3	0,9	1,4	5,1	20,5	49,2
CONT 3	14,5	0,9	1,4	5,1	19,6	49,5
ATG174	15,6	1,0	1,6	4,6	15,4	51,9
AT G717	15,3	0,7	1,4	4,2	17,9	52,1
AT G716	14,9	0,6	1,6	3,1	15,8	55,1
ATG718	15,3	0,8	1,8	4,0	5,4	63,7
AT G709	17,0	0,9	1,9	4,3	3,5	64,0

10 A fim de avaliar a especificidade funcional do clone D15D de *N. crassa* para direcionar a produção de ALA em sementes, a região de codificação de pMON67004 foi clonada em um vetor de expressão específico da semente no qual o promotor Napin direciona a expressão do transgene. O constructo resultante, pMON77214, foi transformado em *A. thaliana* e as

15 sementes de plantas T2 transformadas foram analisadas quanto à composição de ácido graxo. Em linhagens não transformadas, aproximadamente 26% dos lipídeos de semente estavam presente como LA, e aproximadamente 18% como ALA. Em dois eventos de transformação de *A. thaliana* independentes, os níveis de ácido LA foram reduzidos para aproximadamente 14% e 13%, e os níveis de ácido ALA aumentaram para 26% e 30%,

20 respectivamente, indicando atividade de $\Delta 15$ -dessaturase em sementes.

Estes dados são mostrados nas Tabela 3.

TABELA 3. Teor de ácido graxo de Sementes de *Arabidopsis*

EVENTO	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2 (LA)	18:3 (ALA)
Controle	6,86	0,39	2,94	14,7	27,95	17,75
Controle	7,11	0,37	3,33	15,22	26,48	18,11
G709	7,1	0,37	3,13	13,16	24,58	20,85
G711	7,08	0,37	3,16	13,49	24,24	21,07
G705	7,75	0,38	3,09	12,62	19,26	26,3
G707	8,12	0,36	2,98	14,2	15,71	29,74

Estes resultados indicam que a proteína codificada pelo CDNA de *Neurospora* NcD15D é uma $\Delta 15$ -dessaturase funcional em plantas e pode direcionar síntese de ALA em folhas e em sementes.

Exemplo 7

Atividade da $\Delta 15$ -Dessaturase de *Neurospora crassa* em Canola.

Linhagens foram transformadas com constructo pMON77214, que contém a $\Delta 15$ -dessaturase de *Neurospora* direcionada pelo promotor Napin. Ambas as variedades de canola Quantum e Ebony canola foram transformadas e os controles para ambas as variedades incluídos. Dados mostrados na Tabela 4 são percentuais 18:2 (LA) e 18:3 (ALA) em grupos de 20 sementes de plantas R_0 .

TABELA 4. Percentual de PUFA's em Grupos de 20 Sementes de Plantas R_0 .

Linhagem ID	18:2 (LA)	18:3 (ALA)
EBONY	19,78	5,94
EBONY	18,13	7,51
EBONY	19,46	7,56
QUANTUM	22,51	11,09
QUANTUM	23,39	11,17
EBONY	19,11	11,49
QUANTUM	23,05	12,03
QUANTUM	21,04	12,27
BN_G1289	12,48	12,53

BN_G1248	12,55	13,31
BN_G1275	12,67	13,45
BN_G1256	9,33	13,7
BN_G1251	12,3	13,89
BN_G1311	10,07	14,08
BN_G1282	11,41	14,69
BN_G1321	8,98	14,83
BN_G1317	11,17	14,84
BN_G1283	10,54	15,05
BN_G1281	11,66	15,24
BN_G1272	8,12	15,71
BN_G1312	10,36	15,9
BN_G1249	15,65	16,09
BN_G1270	10,46	16,48
BN_G1271	9,45	16,48
BN_G1322	9,57	16,61
BN_G1347	7,18	17,15
BN_G1353	9,84	17,17
BN_G1348	15,69	17,27
BN_G1323	7,33	17,52
BN_G1287	5,95	17,53
BN_G1318	11	17,96
BN_G1389	13,72	18
BN_G1295	10,46	18,03
BN_G1319	7,53	18,44
BN_G1286	7,88	19,11
BN_G1316	5,67	19,32
BN_G1355	9,86	19,38
BN_G1400	14,17	19,4
BN_G1354	6,4	19,72
BN_G1285	8,97	19,77
BN_G1392	8,71	19,84

BN_G1385	9,53	19,89
BN_G1288	7,88	20,04
BN_G1386	14,81	20,16
BN_G1250	3,78	20,28
BN_G1393	10,49	20,55
BN_G1280	5,81	20,63
BN_G1315	8,82	20,76
BN_G1329	8,21	20,77
BN_G1328	3,71	21,09
BN_G1279	5,47	21,18
BN_G1387	11,1	21,32
BN_G1284	4,28	21,33
BN_G1447	7,7	21,76
BN_G1401	4,97	21,82
BN_G1298	9,7	21,99
BN_G1297	7,4	22,15
BN_G1350	5,41	23,5
BN_G1405	7,86	23,73
BN_G1390	7,74	24,52
BN_G1351	9,05	24,78
BN_G1398	6,24	24,82
BN_G1296	4,05	25,04
BN_G1394	7,43	27,34
BN_G1395	9,8	30,17

A produção de ALA em níveis maiores do que ~12% de ácidos graxos de semente nestas linhagens foi indicativa da atividade de $\Delta 15$ -dessaturase heteróloga. O nível mais elevado de ALA observado a partir desta transformação foi em linhagem BN_G1395, que contém 30,17% de ALA.

Para várias das linhagens expressando pMON77214, os ácidos graxos em sementes únicas foram determinados e as linhagens prosseguidas para a geração seguinte. Como esperado, os níveis de ALA aumenta-

ram até quase duas vezes em sementes individuais com relação aos grupos, indicativo de homozigiosidade para os transgenes em segregantes individuais dentro de cada siliqua. Em linhagem BN_1296, a semente de R1 agrupada continha 25,04% de ALA. Na semente única mais elevada desta
5 linhagem (BN_G1296-14), 48,2% de ALA foram observados. Os níveis de ALA em 200 meias-sementes, ordenados do menor ao maior ALA, são mostrados na FIGURA 3.

Exemplo 8

Clonagem da Sequência de Sequência de Δ 15-dessaturase de *A. nidulans* e das Sequências de Δ 12- e Δ 15-Dessaturase de *B. cinerea*.

Com base nas comparações de sequência à sequência genômica de *A. nidulans*, os iniciadores específicos de gene foram designados para amplificar as regiões de codificação de tamanho natural da Δ 15-dessaturase de putativa (AnD15-F1 e AnD15-R1). O iniciador dianteiro foi designado por
15 incluir três nucleotídeos 5' do sítio Met de partida.

AnD15-F1: 5'-AATATGGCTGCAACTGCAACAACCC-3' (SEQ ID NO:23)

AnD15-R1: 5'-TTCCGCTTTGGCACCCTTCTTC-3' (SEQ ID NO:24)

Os iniciadores de oligonucleotídeo BcD12F1 e BcD12R1 foram designados de uma sequência genômica parcial (clone de DNA g parcial
20 proprietário da Monsanto descoberto com BLASTALL) para amplificar as regiões de codificação de tamanho natural de Δ 12-dessaturase de *B. cinerea*. O iniciador degenerado D15D-R9 foi designado para amplificar qualquer Δ 15-dessaturase de *B. cinerea* putativa em uma reação 5'-RACE. O oligonucleotídeo BCD15-F1 foi designado para uma reação de 3' RACE do produto de PCR gerado de oligonucleotídeo D15D-R9. Os oligonucleotídeos
25 BcD15F3 e BcD15R1 F foram designados para amplificar a região de codificação de tamanho natural de Δ 15-dessaturase de *B. cinerea* putativa.

BcD12F1: 5'-GTCGACACCATGGCCTCTACCACTGCTCTC- extremidade 3',
5' contém Sall -3' (SEQ ID NO:25).

30 BcD12R1: 5'-CTGCAGTGCCTTGAGCTTCATTGGTGGTGTA- extremidade 3', 5' contém PstI (SEQ ID NO:26)

D15D-R9: 5'- GCCRTGNCCRCAYTCRTGNGCNAGDAT-3' (SEQ ID NO:27)

BcD15-F1: 5'-ACGATGACTCTCGATTACACAAGTCACCCG-3' (SEQ ID NO:28)

BcD15F3: 5'- GTCGACACGATGACTCTCGATTACACAAGTCACC- extremidade 3', 5' contém Sall (SEQ ID NO:29)

- 5 BcD15R1: 5'- CTGCAGAATGCTTGAGCTATCAGCAGATCCCAA- extremidade 3', 5' contém PstI (SEQ ID NO:30)

CDNA para *A. nidulans* e *B. cinerea* foi preparado empregando-se o *Kit* GeneRacer (Invitrogen). Estes iniciadores foram empregados com CDNA preparado por 3'-RACE para amplificar dessaturases putativas empregando-se um sistema PCR 9700 Gene Amp (PE APPLIED BIOSYSTEMS) com as condições de ciclo recomendadas. O produto de PCR codificando a $\Delta 15$ -dessaturase de *A. nidulans* foi gerado com os oligonucleotídeos AnD15-F1 e AnD15-R1, foi ligado em pYES2.1-TOPO (Invitrogen) e denominado pMON67010 (FIG. 7B). O CDNA foi seqüenciado e três "caixas-His", um aspecto conservado entre dessaturases ligadas à membrana, foram descobertos estarem presentes em posições de aminoácido 93-97, 129-133, e 327-331. As seqüências correspondentes de nucleotídeo e polipeptídeo para a $\Delta 15$ -dessaturase (AnD15D) são fornecidas em SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO:5, respectivamente.

20 Um CDNA codificando $\Delta 12$ -dessaturase de *B. cinerea* foi amplificado por PCR com oligonucleotídeos BcD12F1 e BcD12R1 e subsequentemente ligados diretamente em pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) para gerar pMON67022 (FIG. 7D). O CDNA foi seqüenciado e três "caixas-His", um aspecto conservado entre dessaturases ligadas à membrana, foi descoberto estar presente nas posições de aminoácido 155-159, 191-195, e 390-394. As seqüências correspondentes de nucleotídeo e polipeptídeo para a $\Delta 12$ -desaturase putativa (BcD12D) são fornecidas na SEQ ID NO:31 e SEQ ID NO:32, respectivamente.

30 Para clonar uma $\Delta 15$ -dessaturase de *B. cinerea* um oligonucleotídeo degenerado foi gerado com base em um alinhamento de seqüência de aminoácido do *N. crassa*, e *Aspergillus* sp. $\Delta 12$ e $\Delta 15$ -dessaturases. Uma reação de 5'-RACE foi realizada empregando-se um *Kit* GeneRacer (Invitro-

gen, Carlsbad CA) seguindo as condições recomendadas pelo fabricante. Seguindo a síntese de CDNA, a extremidade 5' de um CDNA de $\Delta 15$ -dessaturase putativo foi amplificada por PCR empregando-se o oligonucleotídeo degenerado D15D-R9 e ligado em pCR2.1-TOPO. O fragmento de 742
5 pares de base resultante foi seqüenciado e determinado por alinhamento de aminoácido deduzido, ser similar às outras $\Delta 15$ -dessaturases fúngicas. Uma reação 3'-RACE foi empregada para amplificar 664 pares de base da extremidade 3' da $\Delta 15$ -dessaturase de *B. cinerea* empregando-se o oligonucleotídeo BcD15-F1 e ligado em pCR2.1-TOPO. Os oligonucleotídeos BcD15F3
10 e BcD15R1 foram designados da seqüência de compósito dos produtos 5'- e 3'- RACE, e empregados para amplificar um CDNA de $\Delta 15$ -dessaturase putativo de *B. cinerea* de tamanho natural por reação de 3'-RACE e ligados em pYES2.1-TOPO. O plasmídeo resultado foi denominado pMON67021 (FIG. 7C). As seqüências de nucleotídeo e polipeptídeo correspondentes para a
15 $\Delta 15$ -dessaturase putativa (BcD15D) são fornecidas em SEQ ID NO:33 e SEQ ID NO:34, respectivamente.

Para avaliar a atividade de $\Delta 15$ -dessaturase do AnD15D putativo no ensaio de expressão de levedura, a levedura expressando a $\Delta 15$ -dessaturase putativa, foi alimentado o substrato para esta enzima, isto é,
20 LA, e a produção de ALA quantificada. Estes dados, nos quais a produção de ALA pela $\Delta 15$ -dessaturase de *N. crassa*, pMON67023, foi comparada com aquelas da $\Delta 15$ -dessaturase de *A. nidulans*, são mostrados na Tabela 5. pMON67023 (FIG. 7E) foi construído como segue:

Nc94F2: 5'-AACATGACGGTCACCAACCCGCAGCCACAAG-3' (SEQ ID
25 NO:35)

Nc94R2: 5'-CTGGGTGCTCTGAACGGTGTGCGCCCAAAT-3' (SEQ ID
NO:36)

Os iniciadores Nc94F2 e Nc94R2 foram empregados para amplificar a região de codificação de NcD15D sem um códon de interrupção. O
30 fragmento resultante foi ligado em pYES2.1-TOPO para gerar uma fusão em estrutura entre a região de codificação de NcD15D e o epítipo V5 e região 6-His contida sobre o vetor de expressão pYES2.1.

TABELA 5. Produção de ALA por $\Delta 15$ -dessaturase de *Neurospora crassa* e $\Delta 15$ -dessaturase de *Aspergillus nidulans*.

Constructo	Gene	Substrato Adicionado como substrato	LA (adicionado)	ALA
pMON67010	AnD15D	LA	28,43	20,32
pMON67010	AnD15D	LA	24,66	19,65
pMON67023	NcD15D	LA	47,98	10,94
pMON67023	NcD15D	LA	47,52	9,24

Estes resultados indicam que neste sistema de expressão, a dessaturase de *A. nidulans* é aproximadamente 2 vezes mais ativa do que NcD15D.

Tabela 6. Análise de utilização de substrato AnD15D em levedura

Constructo	Gene	Substrato			
		Adicionado	GLA	ALA	SDA
pMON67010	AnD15D	-	0	0,54	0
pMON67010	AnD15D	LA	0	16,45	0
pMON67010	AnD15D	GLA	9,19	0,27	8,82
pMON67010	AnD15D	LA+GLA	9,46	5,99	5,35
pMON67010	AnD15D	-	0	0,64	0
pMON67010	AnD15D	LA	0	14,96	0
pMON67010	AnD15D	GLA	8,36	0,27	8,63
pMON67010	AnD15D	LA+GLA	8,1	6,31	5,48

Estes resultados indicam que neste sistema de expressão, o *A. nidulans* D15D é capaz de dessaturar ambos LA e GLA.

Exemplo 9

10 Otimização de Códon da $\Delta 15$ -Dessaturases de *A. nidulans* e *N. crassa* para Soja.

Uma tabela de uso do códon foi construída de 8 proteínas específicas de semente altamente expressas de soja (conglícinina, glicínina, globulina) e 17 proteínas específicas de semente altamente expressas de canola (cuciferina, napin, oleosina). As seqüências de ácido nucléico NcD15D e AnD15D, juntamente com a tabela de uso do códon acima descrita, foram

enviadas para o Blue Heron Biotechnology Inc., (Bothell, Wa), que então utilizou um algoritmo proprietário para gerar as seqüências otimizadas de códon final com as menores estruturas secundárias de RNA de formação de energia livre. A seqüência otimizada por códon de NcD15D foi sintetizada por Blue Heron Biotechnology Inc., e denominada NcD15Dnno (SEQ ID NO:37). A seqüência otimizada por códon de AnD15D foi sintetizada por Midland (Midland, TX), e denominada AnD15Dnno (SEQ ID NO:38).

Exemplo 10

Atividade da $\Delta 15$ -dessaturase de *Neurospora* em combinação com $\Delta 6$ - e $\Delta 12$ -dessaturases de *Mortierella alpina*.

A atividade de $\Delta 15$ -dessaturase de *Neurospora* em combinação com as $\Delta 6$ - e $\Delta 12$ -dessaturases de *Mortierella alpina* foi avaliada transformando-se canola com o constructo pMON77216 (FIG. 7G), que contém as três dessaturases sob o controle do promotor Napin. Em diversas linhagens obtidas, entretanto, a $\Delta 12$ -dessaturase foi descoberta ter sido parcialmente deletada. O teor de ácido graxo de grupos de 10 sementes de plantas R0 individual foi determinado. Os níveis de ácido esteárico (18:0) (SA), ácido oléico (18:1)(OA), LA, ALA, SDA e GLA são mostrados na Tabela 6 abaixo. A linhagem de controle foi Ebony. A semente agrupada de uma maior parte dos eventos transgênicos produzidos conteve SDA mensurável e em 8 eventos o SDA acumulou-se em mais do que 10% dos ácidos graxos.

TABELA 6. Resultados Percentuais da Área Relativa (Percentual em Peso Aprox.) de sementes de R1 agrupadas.

Evento ID	Ácido Graxo (Percentual em Peso)					
	SA	OA	LA	GLA	ALA	SDA
Controle	1,43	66,47	16,85	0	8.7	0
Controle	1,43	60,27	19,65	0,52	11.94	0.07
Controle	1,63	64,93	17,07	0,54	9.68	0.11
BN_G1116	1,66	49,77	25,58	7,16	8.33	0.7
BN_G1117	1,59	41,96	33,82	4,09	10.58	0.71
BN_G1118	1,78	47,16	25,91	10,44	7.66	0.89
BN_G1119	1,97	47,88	24,81	11,54	7.09	0.91
BN_G1120	1,43	44,98	27,22	8,43	10.19	0.97
BN_G1121	1,56	43,29	26,56	13,58	7.42	1.08
BN_G1122	1,74	38,92	30,67	12,01	8.53	1.11
BN_G1123	1,4	56,41	19,49	3,13	11.7	1.19
BN_G1124	1,91	49,21	24,06	4,42	11.66	1.59
BN_G1125	2,32	41,71	22,05	18,62	7.12	1.61
BN_G1126	1,69	65,41	11,8	7,79	4.93	1.69
BN_G1127	2,03	37,12	20,39	25,19	6.07	1.73
BN_G1128	1,78	39,25	22,36	20,9	7.4	1.9

BN_G1129	1,74	31,83	27,51	21,83	8,77	2,04
BN_G1130	2,23	31,55	22,8	29,28	5,39	2,05
BN_G1131	1,84	46,36	22,06	6,47	14,99	2,08
BN_G1132	2,14	32,57	25,79	23,37	7,48	2,16
BN_G1133	1,92	36,46	25,41	19,25	8,3	2,2
BN_G1124	1,66	43,74	22,34	6,57	17,25	2,45
BN_G1135	1,53	43,95	22,08	6,86	16,79	2,6
BN_G1136	2,08	35,91	27,18	7,23	18,86	2,71
BN_G1137	1,77	40,53	23,41	9,63	15,83	2,73
BN_G1138	1,89	42,24	21,84	7	18,34	2,77
BN_G1139	2,17	51,7	17,44	8,07	11,56	3,02
BN_G1140	2,31	43,1	21,72	8,25	15,12	3,04
BN_G1141	1,49	40,03	22,99	5,93	19,6	3,06
BN_G1143	1,7	41,86	22,61	7,97	16,57	3,18
BN_G1144	1,66	40,28	22,74	8,3	17,09	3,27
BN_G1145	1,87	38,9	22,98	8,72	17,88	3,56
BN_G1146	1,87	34,99	24,42	8,54	21	3,67
BN_G1147	2,34	35,19	23,37	8,63	20,12	3,86
BN_G1148	1,85	29,28	29,24	12,95	16,18	3,95

BN_G1149	1,63	37,03	22,9	9,66	20,16	4,29
BN_G1150	2,72	35,99	20,19	10,53	19,67	4,47
BN_G1151	1,62	32,92	23,19	9,25	21,68	4,88
BN_G1152	2,4	30,12	25,47	14,34	15,85	4,93
BN_G1153	2,45	35,53	22,92	11,87	15,36	4,93
BN_G1154	2,31	26,49	19,78	6,29	31,62	5,06
BN_G1155	1,84	34,83	21,08	11,55	18,46	5,36
BN_G1156	1,73	55,09	8,75	2,81	20,2	5,39
BN_G1157	1,87	34,84	21,19	10,88	19,14	5,41
BN_G1158	2,98	29,18	22,71	17,48	14,23	5,9
BN_G1159	2,17	36,41	18,63	10,27	20,3	5,98
BN_G1160	1,85	40,01	17,37	13,86	13,79	6,11
BN_G1161	1,94	29,5	25,74	9,15	20,3	6,12
BN_G1162	1,74	33,78	20,98	12,79	16,98	6,24
BN_G1163	1,84	34,83	21,13	10,28	18,76	6,27
BN_G1164	1,96	37,43	17,03	5,79	24,34	6,45
BN_G1165	1,86	36,5	18,9	11,28	18,7	6,68
BN_G1166	1,95	29,59	24,52	13,72	18,95	6,69
BN_G1167	2,62	25,92	22,63	15,39	19,76	6,69

BN_G1168	2,78	48,4	12,78	6,28	17,57	6,71
BN_G1169	2,92	37,66	17,21	13,51	14,14	7,22
BN_G1170	2,57	26,3	22,62	11,07	22,43	7,25
BN_G1171	2,24	24,1	20,08	28,31	10,8	7,53
BN_G1172	2,79	26,16	20,37	13,4	21,15	7,8
BN_G1173	1,88	28,4	20,84	21,11	13,55	7,93
BN_G1174	2,36	24,04	17,6	28,46	10,82	8,13
BN_G1175	3,43	24,83	20,39	21,68	15,5	8,23
BN_G1176	2,06	30,09	18,23	13,06	20,9	8,23
BN_G1177	1,74	64,72	7,85	2,46	8,1	8,29
BN_G1178	1,62	25,75	19,49	9,12	27,3	8,6
BN_G1179	1,72	30,98	19,19	11,78	20,65	8,95
BN_G1180	2,55	21,39	19,93	26,55	12,19	9,07
BN_G1181	2,53	21,81	21,21	15,3	22,58	9,16
BN_G1182	1,75	24,68	20	14,66	22,4	9,36
BN_G1183	2,42	31,08	16,43	15,08	17,5	9,48
BN_G1184	2,2	26,92	17,92	17,43	18,69	10
BN_G1185	2,58	63,63	4,49	5,11	6,18	10,29
BN_G1186	1,13	55,27	9,21	4,08	12,73	10,29

BN_G1187	2.22	.22	14.97	13.19	16.2	10.46
BN_G1188	2.5	26.64	18.05	19.8	14.58	10.83
BN_G1189	2.41	26.12	18.44	16.81	19.27	11.01
BN_G1190	2.29	36.61	12.21	14.29	14.68	13.31
dc BN_G1191	2.31	18.94	12.95	18.11	22.1	17.95

Os dados de ácido graxo de sementes simples de evento BN_G1824, incluindo igualmente homozigotos e heterozigotos, são mostrados abaixo na Tabela 7. Em um caso, 18,6% de SDA, 17,8% de ALA, 11,2% de LA, 24% de ácido oléico e 18,8% de GLA foram observados. Este evento

5 é referido como um evento SDA elevado / GLA elevado. Em outra semente deste evento, 16,8% de SDA, 7% de ALA, 2% de LA, 62,1% de ácido oléico e 3,1% de GLA foram observados. Este evento é referido como uma linhagem de SDAelevado/GLA baixo. Os dados moleculares indicaram que, nas

10 linhagens de SDA elevado/GLA baixo, a sequência de codificação de $\Delta 2$ não foi funcional. Em particular, foi indicado que as linhagens de SDA elevado/GLA baixo foram compreendidas de uma única cópia de uma inserção de T-DNA parcial única que perdeu todo o DNA de inserção entre a fronteira

15 esquerda e os 51 pares de base tseminais da região de codificação da $\Delta 12$ -dessaturase de *Mortierella alpina* $\Delta 12$ -desaturase (por exemplo, os últimos 51 pares de base de SEQ ID NO:41). Notável na linhagem de SDA elevado/GLA baixo é que o ácido oléico está quase em níveis tipo silvestre visto que nas linhagens de SDA elevado/GLA elevado, o ácido oléico é reduzido

aproximadamente 2,5 vezes com respeito ao tipo silvestre. As linhagens que exibem o fenótipo de SDA elevado/oléico elevado são realçadas com cinza.

TABELA 7. Resultados Percentuais de Área Relativa (Percentual em peso Aprox.) de Semente Única de R1 de BN G1190.

Linhagem nº	Composição de Ácido Graxo (Percentual em Peso)					
	SA	OA	LA	GLA	ALA	SDA
1	1,29	64,94	19,96	0	9,07	0
2	1,53	65,62	16,5	0	10,01	0
3	1,4	61,38	20,02	0	11,78	0,02
4	1,78	65,09	17,67	0,02	9,22	0,15
5	1,53	60,94	7,8	3,55	14,13	5,23
6	2,01	61,95	7,1	4,2	12,34	5,79
7	1,8	59,54	5,5	4,47	12,81	9,2
8	2,16	25,6	17,86	19,69	18,91	9,28
9	1,9	61,92	4,71	3,25	12,71	9,34
10	4,79	22,52	14,36	29,86	9,84	10,29
11	2,81	61,55	3,92	2,79	11,89	10,46
12	2,07	61,13	4,36	4,37	10,9	10,47
13	1,57	59,75	4,27	3,3	13,01	11

14	1,89	63,95	3,54	2,88	10,29	11,09
15	1,95	62,9	4	3,53	10,35	11,29
16	2,04	60,91	4,2	3,2	12,16	11,37
17	2,37	49,02	7,68	12,6	9,45	11,48
18	1,88	62,52	3,41	4,25	9,09	11,79
19	2,4	25,65	16,6	17,6	18,36	12,03
20	3,31	25,5	16,45	16,69	18,76	12,12
21	5,64	20,98	12,57	29,74	10,03	12,17
22	2,51	24,55	15,7	17,28	19,83	12,23
23	2,62	25,54	15,55	18,14	18,87	12,45
24	3,35	22,96	14,87	23,38	14,62	12,98
25	2,2	24,61	15,99	17,98	18,5	13,61
26	1,62	58,5	3,48	3,09	12,36	13,66
27	3,77	24,48	14,69	18,4	16,75	13,85
28	2,51	23,72	15,35	16,53	19,8	14,24
29	2,46	24,04	13,81	18,61	19,94	14,31
30	2,44	23,63	14,82	20,44	16,85	14,35
31	1,85	64,75	1,94	2,85	7,01	14,55
32	2,04	19,45	14,32	15,63	25,95	14,73

33	2,24	23,34	14,79	18,9	18,22	14,84
34	3,55	23,16	12,92	21,86	15,59	15,12
35	3,17	24,94	12,74	18,41	16,98	15,26
36	2,36	21,79	14,57	23,35	13,99	15,38
37	2,55	23,14	14,94	19,56	17,3	15,39
38	2,53	23,44	14,99	16,32	19,84	15,46
39	2,09	58,1	2,87	3,21	11,23	15,52
40	2,22	61,6	2,44	3,32	8,34	15,58
41	4,1	23,71	13,78	17,72	18,09	15,63
42	2,34	22,81	13,35	19,72	19,09	15,67
43	3,71	21,49	13,43	22,95	14,94	15,98
44	4,05	23,04	13,77	20,1	15,43	16,18
45	2,57	24,02	12,05	19,87	17,05	16,46
46	2,09	62,09	1,98	3,08	7,06	16,75
47	3,17	21,82	13,7	16,23	21,06	16,82
48	4,07	22,52	12,25	19,85	16,27	16,86
49	2,46	22,48	12,5	20,28	17,02	17,66
50	2,78	24,11	11,17	18,82	17,75	18,59

A fim de também avaliar a atividade das $\Delta 15$ -dessaturase de *Neurospora crassa* em combinação com as $\Delta 6$ - e $\Delta 12$ -dessaturases de *M. alpina*, linhagens homozigotas para constructo pCGN5544 (contendo $\Delta 6$ - e $\Delta 12$ -dessaturases de *M. alpina*), que continham até 35% de GLA em óleos de semente, foram retransformadas com o constructo pMON77214 contendo NcD15D. Vinte grupos de semente de 11 plantas R₀ foram analisados. O LA, ALA, SDA e GLA nestas linhagens são mostrados em Tabela 8.

TABELA 8. Análise dos Resultados Percentuais de Área Relativa (Percentual em peso Aprox.) de Semente de Grupo R1.

Linhagem	LA	ALA	SDA	GLA
Controle Ebony	16,05	8,7	0	0
Controle Ebony	17,46	9,05	0	0
BN_1569	21,19	11	0,11	30,1
BN_1561	25,35	14,7	1,57	6,03
BN_1566	29,26	14,03	1,75	9,04
BN_1564	17,92	26,51	2,33	4,5
BN_1644	24,25	16,1	4,05	16,64
BN_1527	22	15,97	4,17	10,44
BN_1563	20,13	17,26	4,52	12,11
BN_1609	22,46	23,76	5,22	11,39
BN_1622	9,1	15,77	6,33	5,23
BN_1680	21,47	19,19	11,19	19,07
BN_1624	12,95	22,1	17,95	18,11

Exemplo 11

Atividade da $\Delta 15$ -Dessaturase de *Neurospora crassa* em Combinação com a $\Delta 6$ -Dessaturase de *Mortierella alpina*.

A atividade da $\Delta 15$ -dessaturase de *Neurospora crassa* em combinação com a $\Delta 6$ -dessaturase de *Mortierella alpina* foi avaliada transformando-se canola com o constructo pMON77215 (FIG. 7F), que contém as duas dessaturases sob o controle do promotor Napin. Este vetor foi construído digerindo-se pCGN5536 (Patente dos Estados Unidos nº 6.459.018

B1), que contém o promotor Napin direcionando a expressão da $\Delta 6$ -dessaturase de *M. alpina* (MaD6D), com NotI e em seguida ligando-se o fragmento de cassete de expressão no sítio Not I do vetor binário, pMON70660, para formar pMON77212. O plasmídeo pMON77215 foi construído digerindo-se pMON77214 com PmeI e Ascl e em seguida ligando-se o fragmento de cassete de expressão NcD15D de Napin nos sítios SwaI e Ascl de pMON77212, para fornecer um constructo contendo ambos MaD6D e NcD15D.

O teor de ácido graxo de grupos de 10 sementes de transformantes de canola R0 individuais foi determinado. Os níveis de SA, OA, LA, ALA, SDA e GLA são mostrados na Tabela 9 abaixo. A linhagem de controle foi Ebony (SP30052). A semente agrupada de uma maioria dos eventos transgênicos produzidos continha SDA mensurável e em 25% dos eventos (10 dos 40) SDA acumularam para mais do que 10% dos ácidos graxos .

TABELA 9. Resultados Percentuais da Área Relativa (Percentual em Peso Aprox.) para Semente de R1 Agrupada de pMON77215.

Evento ID	Ácido Graxo (Percentual em Peso)					
	SA	AO	LA	GLA	ALA	SDA
Controle de Ebony	1,43	66,47	16,85	0	8,7	0
BN_G2463	1,98	63,51	17,96	0,13	9,9	0,1
BN_G2444	1,62	60,61	19,58	0,13	11,38	0,36
BN_G2443	1,47	59,39	17,8	3,42	10,2	1,1
BN_G1700	1,69	65,41	11,8	7,79	4,93	1,69
BN_G2082	1,84	59,51	16,72	4,45	10,16	1,73
BN_G2316	2,19	66,1	11,49	7,17	4,24	2,24
BN_G2083	1,89	61,57	12,61	7,29	7,02	2,28
BN_G2413	1,97	64,12	9,74	1,58	11,09	4,63
BN_G2317	2,74	66,72	6,92	0,44	10,42	5,13
BN_G2412	2,31	61,63	8,48	1,66	13,6	5,21
BN_G2315	2,91	64,38	10,22	0,91	6,07	5,28
BN_G2028	1,91	61,48	10,25	2,2	11,59	5,59
BN_G2357	2,51	64,17	8,28	0,85	10,42	5,62

BN_G2027	2,13	53,72	12,39	2,6	15,72	5,78
BN_G2360	2,51	62,75	9,47	4,89	7,17	5,84
BN_G2390	3,2	63,66	8,44	0,5	10,2	5,88
BN_G2029	1,78	61,89	10,41	1,44	11,12	6,35
BN_G2414	2,07	57,13	11	2,36	14,07	6,44
BN_G2416	2,26	65,01	7,17	0,83	11,86	6,45
BN_G2250	2,19	61,99	8,8	1,93	9,72	6,6
BN_G1698	1,82	68,26	6,4	3,76	6,55	6,65
BN_G2356	2,82	62,46	11,52	1,75	6,99	6,84
BN_G1937	2	56,02	10,92	2,24	12,6	7,81
BN_G2319	1,99	58,47	9,63	5,86	9,05	7,91
BN_G1699	1,74	64,72	7,85	2,46	8,1	8,29
BN_G2359	2,96	64,17	7,09	2,05	7,67	8,88
BN_G2460	2,54	62,4	5,33	1,43	11,43	9,63
BN_G2409	3,27	57,85	9,71	3,97	7,44	9,87
BN_G2318	2,54	61,04	7,6	2,37	8,43	9,99
BN_G2358	2,76	62,33	5,88	2,06	8,72	10,08
BN_G1697	2,58	63,63	4,49	5,11	6,18	10,29
BN_G1803	1,13	55,27	9,21	4,08	12,73	10,29
BN_G2391	2,83	58,33	11,45	2,42	6,6	10,57
BN_G1859	2,33	52,66	9,71	2,98	12,19	11,03
BN_G2389	2,54	59,21	6,97	3,88	8,07	11,84
BN_G1860	2,22	51,02	9,49	4,62	10,5	13,44
BN_G2410	3,24	55,96	7,03	3,1	8,88	13,82
BN_G2445	2,77	57,67	6,21	2,78	9,62	14,14
BN_G2361	2,31	56,5	8,86	3,77	6,48	14,78

Os dados de ácido graxo de sementes simples do evento BN_G1860, incluindo ambos homozigotos e heterozigotos, são mostrados abaixo na Tabela 10. Em um caso, até 19% de SDA, 10% de ALA, 7% de LA, 48% de Ácido oléico e 5% de GLA foram observados.

TABELA 10. Resultados Percentuais da Área Relativa (Percentual em Peso Aprox.) para Semente de R1 simples de pMON77215 de BN_G1860.

Evento ID	Ácido Graxo (Percentual em Peso)					
	SA	OA	LA	GLA	ALA	SDA
BN_G1860-1	1,57	65,11	16,5	0	10,47	0,01
BN_G1860-2	1,4	57,32	19,05	0	15,3	0,02
BN_G1860-3	1,74	60,16	19,44	0	11,95	0,03
BN_G1860-4	1,77	56,85	8,11	6,79	9,11	9,96
BN_G1860-5	2,37	57,88	5,26	2,94	12,72	11,48
BN_G1860-6	1,72	60,18	5,03	2,87	11,42	11,71
BN_G1860-7	2,53	55,86	9,31	6,08	5,96	12,23
BN_G1860-8	2,21	56,83	7,48	5,93	8,52	12,38
BN_G1860-9	2,12	60,21	4,83	2,8	10,13	12,43
BN_G1860-10	3,12	56,6	10,33	4,54	4,5	12,48
BN_G1860-11	2,2	53,64	12,32	5,54	4,73	12,88
BN_G1860-12	2,25	55,58	10,53	5,07	5,42	13,53
BN_G1860-13	2,03	57,57	7,08	4,19	8,15	13,69
BN_G1860-14	1,76	54,42	7,16	6,43	8,99	13,77
BN_G1860-15	2,77	57,4	8,5	4,17	5,73	13,78
BN_G1860-16	1,43	55,39	9,93	5,62	6,38	13,82
BN_G1860-17	2,91	53,02	10,79	4,34	5,89	13,92
BN_G1860-18	1,92	60,27	3,72	1,96	10,7	13,92
BN_G1860-19	1,85	59,6	4,72	2,56	9,85	14,16
BN_G1860-20	2,45	58,84	6,51	3,66	6,88	14,22
BN_G1860-21	1,88	57,95	5	2,85	10,56	14,42
BN_G1860-22	1,91	55,15	6,02	5,3	9,2	14,75
BN_G1860-23	3,01	59,08	5,36	2,88	7,33	14,85
BN_G1860-24	2,94	56,48	6,78	3,95	7,83	14,86
BN_G1860-25	2,34	53,88	8,64	4,49	6,42	14,94
BN_G1860-26	2,75	52,92	7,04	4,38	9,4	14,96
BN_G1860-27	1,7	57,28	4,41	2,99	10,74	15,05

BN_G1860-28	2,3	53,15	9,42	5,79	6,53	15,29
BN_G1860-29	2,9	54,49	6,2	3,73	7,92	15,38
BN_G1860-30	1,8	58,02	4	2,41	10,67	15,42
BN_G1860-31	2,67	54,97	7,32	4,68	7,92	15,44
BN_G1860-32	2,31	56,01	5,09	4,34	9,93	15,47
BN_G1860-33	2,18	55,92	8,83	4,06	5,46	15,54
BN_G1860-34	2,38	54,85	8,52	4,01	5,76	15,56
BN_G1860-35	1,99	58,89	4,14	2,09	9,74	15,58
BN_G1860-36	2,87	55,91	6,55	2,8	7,37	15,66
BN_G1860-37	2,35	53,18	8,89	4,73	6,45	15,71
BN_G1860-38	3,15	51,6	10,29	4,85	5,68	15,78
BN_G1860-39	2,31	55,68	6,08	4,52	7,81	15,92
BN_G1860-40	3,26	54,62	6,54	3,55	7,53	16,19
BN_G1860-41	2,09	56,03	6,27	4,04	7,56	16,35
BN_G1860-42	2,33	53,62	6,48	5,35	7,97	16,62
BN_G1860-43	2,37	57,86	5,24	2,81	7,32	16,77
BN_G1860-44	2,04	51,3	11,41	5,03	5,09	16,94
BN_G1860-45	2,1	53,32	8,75	4,04	6,44	17,12
BN_G1860-46	2,14	53,01	6,85	4,3	7,82	17,16
BN_G1860-47	2,42	50,96	7,83	4,13	7,91	17,44
BN_G1860-48	1,94	49,97	10,64	4,78	5,74	17,84
BN_G1860-49	1,46	55,32	4,57	2,67	9,98	18
BN_G1860-50	2,41	47,66	6,83	5,46	9,91	19,23

Exemplo 12

Otimização de Códon da Sequência de $\Delta 15$ -Dessaturase de *N. crassa* para Milho.

- 5 Uma tabela de uso de códon foi construída de 9 genes específicos de semente altamente expressos de milho (seis zeínas e três oleosinas). Empregando-se esta tabela, dois códons de NcD15D foram mutados empregando-se o *Kit* de Mutagênese Direcionada ao Sítio QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA) e a sequência resultante foi denominada NcFAD3m (SEQ ID NO:42). Os códons alterados foram como segue: 1) para preparar

- um sítio de partida translacional mais preferido, uma alanina em SEQ ID NO:2 é substituída com uma treonina alterando-se a primeira base do segundo códon (posição 4 em SEQ ID NO: 42) de um ACG para GCG; e 2) para remover um códon raro, um códon de valina foi alterado de GTA para GTG na posição position 882 (SEQ ID NO: 42).

Exemplo 13

Equivalência de EPA.

- Uma medida de qualidade de óleo de semente para valor de saúde é a equivalência de EPA. O valor reflete a taxa de conversão metabólica para EPA. Isto é calculado adicionando-se o % de ALA dividido por 14 e o % de SDA dividido por 4. As composições de óleo de canola obtidas pelos inventores tiveram uma elevada equivalência de EPA, indicando excelentes características para obtenção dos níveis de EPA aumentados associados com os benefícios de saúde em seres humanos e animais. Um exemplo da análise é fornecido abaixo por comparação de óleo de canola convencional relativo a um exemplo de uma composição de óleo de SDA elevada típica de 10% de ALA e 15% de SDA. O óleo de canola de variedades convencionais tem aproximadamente 12% de ALA e 0% de SDA e desse modo tem uma equivalência de EPA de $12/14 + 0/4 = 0,8$. Ao contrário, o exemplo de composição de óleo de SDA elevada tem uma equivalência de EPA de $10/14 + 15/4 = 4,4$. Os valores relativos são mostrados abaixo. Os valores são em % em peso, não em uma base servi. A vasta diferença mostra a importância de produzir SDA em óleo de canola.

TABELA 11. Comparação de Equivalência de EPA.

Óleo Ve- getal	Total de ômega-3 (% de ácidos gra- xos)	Relação de n-6:n-3 (% de ácidos gra- xos)	Equivalência de EPA Relativa. (peso% ALA + SDA)
Canola	12	2,6:1	0,8
SDA Ca- nola	50	1:5	4,4

REFERÊNCIAS

As referências listadas abaixo são incorporadas aqui por referência na medida em que elas suplementam, explicam, fornecem uma base para, ou ensinam metodologia, técnicas, e/ou composições aqui empregadas.

- 5
- Patente dos Estados Unidos nº 4.535.060
Patente dos Estados Unidos nº 4.666.701
Patente dos Estados Unidos nº 4.758.592
Patente dos Estados Unidos nº 4.826.877
- 10
- Patente dos Estados Unidos nº 4.910.141
Patente dos Estados Unidos nº 5.011.770
Patente dos Estados Unidos nº 5.116.871
Patente dos Estados Unidos nº 5.302.523
Patente dos Estados Unidos nº 5.322.783
- 15
- Patente dos Estados Unidos nº 5.378.619
Patente dos Estados Unidos nº 5.384.253
Patente dos Estados Unidos nº 5.464.765
Patente dos Estados Unidos nº 5.508.184
Patente dos Estados Unidos nº 5.508.468
- 20
- Patente dos Estados Unidos nº 5.538.877
Patente dos Estados Unidos nº 5.538.880
Patente dos Estados Unidos nº 5.545.818
Patente dos Estados Unidos nº 5.550.318
Patente dos Estados Unidos nº 5.563.055
- 25
- Patente dos Estados Unidos nº 5.591.616
Patente dos Estados Unidos nº 5.610.042
Patente dos Estados Unidos nº 5.952.544
Abdullah e outros, Biotechnology, 4:1087, 1986.
Arondel, Science, 258(5086):1353-1355, 1992.
- 30
- Ausubel e outros, Em: Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Assoc., NY, 1987.*
Barton e outros, Cell, 32:1033, 1983.

- Bates, *Mol. Biotechnol.*, 2(2):135-45, 1994.
- Battraw e Hall, *Theor. App. Genet.*, 82(2):161-168, 1991.
- Bechtold e outros, *CR. Acad. Sci. Life Sci.*, 316:1194-1199, 1993.
- Becker e Guarente, *Methods Enzymol.*, 194:182-187, 1991.
- 5 Bent e outros, *Science*, 265:1856-1860, 1994.
- Bent e outros (1994), *Science* 265:1856-1860
- Bevan e outros, *Nucleic Acids Res.*, 11(2):369-385, 1983.
- Bevan, *Nucleic Acids Res.*, 12:8111, 1984.
- Bhattacharjee, An, Gupta, *J. Plant Bioch. Biotech.*, 6(2):69-73. 1997.
- 10 Bouchez e outros, *EMBO Journal*, 8(13):4197-4204, 1989.
- Bower e outros, *J. Plant*, 2:409-416. 1992.
- Bray, 1987
- Brenner e outros, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 83:85-101, 1976.
- Buchanan-Wollaston e outros, *Plant Cell Reports*, 11:627-631. 1992
- 15 Buising e Benbow, *Mol. Gen. Genet.*, 243(1): 71-81, 1994.
- Bustos e outros, *J. Bacteriol.*, 174: 7525-7533, 1991.
- Callis e outros, *Genes Dev.*, 1: 1183-1200, 1987.
- Casa e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(23): 11212-11216, 1993.
- Case e outros, *Neurospora Newsletter*, 8: 25-26, 1965.
- 20 Chandler e outros, *The Plant Cell*, 1:1175-1183, 1989.
- Chomczynski e Sacchi, *Anal. Biochem.*, 162(1): 156-159, 1987.
- Chou e Fasman, *Adv. Enzymol.*, 47:45-148, 1978.
- Christou e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(12): 3962-3966, 1987.
- Conkling e outros, *Plant Physiol.*, 93: 1203-1211, 1990.
- 25 Crozier, *Lipids*, 24:460, 1989.
- De Block e outros, *Plant Physiol.*, 91: 694-701, 1989.
- De Block e outros, *The EMBO Journal*, 6(9): 2513-2518, 1987.
- De Deckerer, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 52: 749, 1998.
- DeBlock e outros, *J. EMBO*, 2: 2143, 1984.
- 30 Dellaporta e outros, *In: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts*, 18th Stadler Genetics Symposium, 11: 263-282, 1988.
- Denmark Appl. DE 3642 829

- D'Halluin e outros, *Plant Cell*, 4(12): 1495-1505, 1992.
- Ebert e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:5745-5749, 1987
- Ellis e outros, *EMBO Journal*, 6(11): 3203-3208, 1987.
- Europ. Appl. 154,204
- 5 Fraley e outros, *Bio/Technology*, 3: 629-635, 1985.
- Fromm e outros, *Nature* 319: 791-793, 1986
- Fromm e outros, *Nature*, 319: 791-793, 1986.
- Gallie e outros, *The Plant Cell*, 1: 301-311, 1989.
- Gelvin e outros, Em: *Plant Molecular Biology Manual*, 1990.
- 10 Ghosh-Biswas e outros, *J. Biotechnol.*, 32(1): 1-10, 1994.
- Goeddel, Em: *Methods in Enzymology*, Perbal (Ed.), Academic Press, John Wiley e Sones, 185, 1988.
- Hagio, Blowers, Earle, *Plant Cell Rep.*, 10(5): 260-264, 1991.
- Hamilton e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(18): 9975-9979, 1996.
- 15 Haseloff e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(6): 2122-2127, 1997.
- He e outros, *Plant Cell Reports*, 14 (2-3): 192-196, 1994.
- Hensgens e outros, *Plant Mol. Biol.*, 22(6): 1101-1127, 1993.
- Hiei e outros, *Plant. Mol. Biol.*, 35(1-2): 205-218, 1997.
- Hinchee e outros, *Bio/technol.*, 6: 915-922, 1988.
- 20 Horrobin e outros, *Am. J. Clin. Nutr.*, 57(Suppl): 732S-737S, 1993.
- Horsch e outros, *Science*, 223: 496, 1984.
- Horsch e outros, *Science*, 227: 1229, 1985.
- Hou e Lin, *Plant Physiology*, 111: 166, 1996.
- Huang, *Biochem. Biophys. Acta*, 1082: 319, 1991.
- 25 Hudspeth e Grula, *Plant Mol. Biol.*, 12: 579-589, 1989.
- Ikuta e outros, *Bio/technol.*, 8: 241-242, 1990.
- Ishidia e outros, *Nat. Biotechnol.*, 14(6): 745-750, 1996.
- IUPAC-IUB, *Nucl. Acid Res.*, 13: 3021-3030, 1985.
- James e outros, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 75: 234, 1997.
- 30 James e outros, *Semin. Arthritis Rheum.*, 28: 85, 2000.
- Kaeppler e outros, *Plant Cell Reports*, 9: 415-418, 1990.
- Kaeppler e outros, *Theor. Appl. Genet.*, 84(5-6): 560-566, 1992.

- Katz e outros, *J. Gen. Microbiol.*, 129: 2703-2714, 1983.
- Klee e outros, *Bio-Technology*, 3(7): 637-642, 1985.
- Klein e outros, *Nature*, 327: 70, 1987.
- Knittel e outros, *Plant Cell Reports*, 14(2-3): 81-86, 1994.
- 5 Knutzon e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(7): 2624-2628, 1992.
- Kyte e Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157: 105-132, 1982.
- Lawton e outros, *Plant Mol. Biol.* 9: 315-324, 1987.
- Lazzeri, *Methods Mol. Biol.*, 49: 95-106, 1995.
- Lee e outros, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13(1): 54-59, 1989.
- 10 Lorz e outros, *Mol Gen Genet*, 199: 178-182, 1985.
- Manzioris e outros, *Am. J. Clin. Nutr.*, 59: 1304, 1994.
- Marcotte e outros, *Nature*, 335: 454, 1988.
- McCabe, Martinell, *Bio-Technology*, 11(5): 596-598, 1993.
- McCormac e outros, *Euphytica*, 99(1): 17-25, 1998.
- 15 Meesapyodsuk e outros, *Biochemistry*, 39(39): 11948-11954, 2000.
- Michaelis e outros, *Ann. Rev. Microbiol.*, 36: 425, 1982.
- Murakami e outros, *Mol. Gen. Genet.*, 205: 42-50, 1986.
- Nagatani e outros, *Biotech. Tech.*, 11(7): 471-473, 1997.
- Naylor e outros, *Nature*, 405: 1017, 2000.
- 20 Odell e outros, *Nature*, 313: 810-812, 1985.
- Ogawa e outros, *Sci. Rep.*, 13: 42-48, 1973.
- Omirulleh e outros, *Plant Mol. Biol.*, 21(3): 415-28, 1993.
- Ow e outros, *Science*, 234: 856-859, 1986.
- Pedido PCT WO 9217598
- 25 Pedido PCT WO 94/09699
- Pedido PCT WO 95/06128
- Pedido PCT WO 96/33155
- Pedido PCT WO 97/4103
- Pedido PCT WO 97/41228
- 30 Potrykus e outros, *Mol. Gen. Genet.*, 199(2): 169-77, 1985.
- Potrykus e outros, *Mol. Gen. Genet.*, 199: 183-188, 1985.
- Prasher e outros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 126(3): 1259-1268,

- 1985.
- Reed e outros, *Plant Physiol.*, 122: 715-720, 2000.
- Reichel e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (12) pp 5888-5893. 1996
- Restrepo e outros, *Plant Cell*, 2: 987, 1990.
- 5 Rhodes e outros, *Methods Mol. Biol.*, 55: 121-131, 1995.
- Ritala e outros, *Plant Mol. Biol.*, 24(2): 317-325, 1994.
- Rogers e outros, *Methods Enzymol.*, 153: 253-277, 1987.
- Sambrook e outros, *Em: Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- 10 Sheen e outros, *Plant Journal*, 8(5): 777-784, 1995.
- Simopoulos e outros, *Am. Coll. Nutr.*, 18: 487, 1999.
- Singsit e outros, *Transgenic Res.*, 6(2): 169-176, 1997.
- Spencer e outros, *Plant Molecular Biology*, 18: 201-210, 1992.
- Stalker e outros, *Science*, 242: 419-422, 1988.
- 15 Sullivan e outros, *Mol. Gen. Genet.*, 215(3): 431-440, 1989.
- Sutcliffe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 3737-3741, 1978.
- Thillet e outros, *J. Biol. Chem.*, 263: 12500-12508, 1988.
- Thompson e outros, *Euphytica*, 85(1-3): 75-80, 1995.
- Thompson e outros, *The EMBO Journal*, 6(9): 2519-2523, 1987.
- 20 Tian e outros, *Plant Cell Rep.*, 16: 267-271, 1997.
- Tingay e outros, *Plant J.*, 11(6): 1369-1376, 1997.
- Tomes e outros, *Plant Mol. Biol.*, 14(2): 261-268, 1990.
- Torbet e outros, *Crop Science*, 38(1): 226-231, 1998.
- Torbet e outros, *Plant Cell Reports*, 14(10): 635-640, 1995.
- 25 Toriyama e outros, *Theor Appl. Genet.*, 73: 16, 1986.
- Tsukada e outros, *Plant Cell Physiol.*, 30(4): 599-604, 1989.
- Twell e outros, *Plant Physiol.*, 91: 1270-1274, 1989.
- Uchimiya e outros, *Mol. Gen. Genet.*, 204: 204, 1986.
- Van den Broeck e outros, *Nature*, 313: 358, 1985.
- 30 Van Eck, Blowers; Earle, *Plant Cell Reports*, 14(5): 299-304, 1995.
- Vasil e outros, *Plant Physiol.*, 91: 1575-1579, 1989.
- Vasil e outros, *Plant Physiol.*, 91: 1575-1579, 1989.

- Walker e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 6624-6628, 1987.
- Wang e outros, *Molec. Cell. Biol.*, 12(8): 3399-3406, 1992.
- Wolk e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1561-1565, 1984.
- Yamada e outros, *Plant Cell Rep.*, 4: 85, 1986.
- 5 Yamazaki e outros, *Biochem. Biophys. Acta*, 1123: 18, 1992.
- Yang e Russell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 4144-4148, 1990.
- Zheng e Edwards, *J. Gen. Virol.*, 71: 1865-1868, 1990.
- Zhou e outros, *Plant Cell Reports*, 12(11): 612-616, 1993.
- Zukowsky e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 1101-1105, 1983.

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleotídeo recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência promotora heteróloga funcional em plantas, ligada operacionalmente a uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo tendo atividade de dessaturase que dessatura uma molécula de ácido graxo no carbono 15, em que o ácido nucleico é um polinucleotídeo compreendendo a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO: 33.

2. Polinucleotídeo recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido polinucleotídeo é de um filo selecionado do grupo consistindo em zigomicota, basidiomicota, e ascomicota.

3. Polinucleotídeo recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo é de uma espécie selecionada do grupo consistindo em *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* e *Botrytis cinerea*.

4. Polinucleotídeo recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo codifica o polipeptídeo de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 ou SEQ ID NO:34.

5. Polinucleotídeo recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo compreende a sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 ou SEQ ID NO: 33.

6. Vetor recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo recombinante, como definido na reivindicação 1.

7. Vetor recombinante de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que compreende ainda pelo menos uma sequência adicional escolhida do grupo consistindo em:

(a) sequências reguladoras operativamente ligadas ao polinucleotídeo recombinante;

(b) marcadores de seleção operativamente ligados ao

polinucleotídeo recombinante;

(c) sequências marcadoras operativamente ligadas ao polinucleotídeo recombinante;

(d) uma porção de purificação operativamente ligada ao polinucleotídeo recombinante; e

(e) uma sequência alvo operativamente ligada ao polinucleotídeo recombinante.

8. Vetor recombinante de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que compreende um promotor operavelmente definido para o referido polinucleotídeo recombinante.

9. Vetor recombinante de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o promotor é um promotor regulado de maneira desenvolvida, específico de organela, específico de tecido, constitutivo ou específico de célula.

10. Vetor recombinante de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o referido promotor é selecionado do grupo consistindo em 35S CaMV, 34S FMV, *Napin*, 7S, Glob, e Lec.

11. Vetor recombinante de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de ser um cassete de expressão.

12. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de ser transformada com o vetor recombinante, como definido na reivindicação 6, em que a célula hospedeira é selecionada de uma célula de bactéria ou de fungo.

13. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira expressa uma proteína codificada pelo referido vetor.

14. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que a célula herdou o vetor recombinante de um progenitor da célula.

15. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que a célula foi transformada com o vetor recombinante.

16. Método para produção de óleo de semente contendo ácidos graxos de ômega-3 de sementes de planta, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- 5 (a) obter as sementes de uma planta transgênica transformada com o vetor recombinante, como definido na reivindicação 6; e
(b) extrair o óleo das referidas sementes.

17. Método para a produção de uma planta contendo óleo de semente contendo níveis aumentados de ácidos graxos de ômega-3 em relação a uma planta não transformada, caracterizado pelo fato de que
10 compreende introduzir o vetor recombinante como definido na reivindicação 6 em uma planta de produção de óleo.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que introduzir o vetor recombinante compreende reprodução de planta.

15 19. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que introduzir o vetor recombinante compreende as etapas de:

(a) transformar uma célula de planta com o vetor recombinante como definido na reivindicação 6; e

20 (b) regenerar a referida planta a partir da célula da planta, em que a planta tem níveis aumentados de ácidos graxos de ômega-3 em relação a uma planta não transformada.

20. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a planta é uma planta selecionada do grupo consistindo em *Arabidopsis thaliana*, *Brassica* de semente oleosa, semente de colza,
25 girassol, açafoa, canola, milho, soja, algodão, linho, jojoba, árvore de sebo Chinesa, tabaco, cacau, amendoim, plantas frutíferas, plantas cítricas, e plantas de produção de nozes e bagas.

21. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a planta é transformada com uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo tendo atividade de dessaturase que
30 dessatura uma molécula de ácido graxo no carbono 6.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado

pelo fato de que ácido estearidônico é melhorado.

23. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que compreende introduzir o vetor recombinante como definido na reivindicação 6 em diversas plantas de produção de óleo e analisar as referidas plantas ou progênie destas tendo herdado o vetor recombinante para uma planta tendo níveis aumentados de ácidos graxos de ômega-3 em relação a uma planta não transformada.

24. Óleo de semente de canola endógeno, caracterizado pelo fato de que tem um teor de ácido estearidônico de cerca de 8% a cerca de 27% e um teor de ácido oleico de 40% a 70%, em que o referido óleo é produzido a partir de uma planta transgênica transformada com o polinucleotídeo recombinante como definido na reivindicação 1.

25. Óleo de semente de canola de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que compreende menos do que 10% de ácido alfa-linoleico, ácido linoleico e ácido gama-linoleico, combinados.

26. Óleo de semente de canola de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o teor de ácido estearidônico é de 10% a 20%.

27. Óleo de semente de canola de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o teor de ácido estearidônico é de 12% a 17%.

28. Óleo de semente de canola de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o teor de ácido oleico é de 45% a 65%.

29. Óleo de semente de canola de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o teor de ácido oleico é de 55% a 65%.

30. Óleo de semente de canola de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o teor de ácido estearidônico é de 12% a 17% e o teor de ácido oleico é de 55% a 65%.

31. Óleo de semente de canola de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de ser de semente de *Brassica napus*.

32. Óleo de semente de canola de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de ser de semente de colza de *Brassica*.

33. Óleo de semente de canola de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a relação de ácidos graxos de ômega-6 para ômega-3 no óleo é de 1:1 a 1:4.

5 34. Óleo de semente de canola de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que a relação de ácidos graxos de ômega-6 para ômega-3 no óleo é de 1:2 a 1:4.

35. Método para aumentar o valor nutricional de um produto comestível para consumo humano ou animal, caracterizado pelo fato de que compreende adicionar o óleo de semente de canola, como definido na
10 reivindicação 24, ao produto comestível.

36. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o produto comestível é alimento humano.

37. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o produto comestível é alimentação animal.

15 38. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o produto comestível é um suplemento alimentar.

39. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o óleo de semente de canola aumenta o teor de ácido estearidônico do produto comestível em relação a um produto comestível
20 destituído de óleo de semente de canola.

40. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o produto comestível tem uma redução da relação de ácidos graxos ômega-6 para ômega-3 em relação a um produto comestível destituído de óleo de semente de canola.

25 41. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o produto comestível não tem ácido estearidônico antes da adição ao óleo de semente de canola.

42. Método de fabricação de alimento ou alimentação, caracterizado pelo fato de que compreende adicionar o óleo de semente de canola, como definido na reivindicação 24, aos ingredientes de alimento ou
30 alimentação de partida para produzir o alimento ou alimentação.

43. Método de acordo com a reivindicação 42, caracterizado

pelo fato de ser um método de fabricação de alimento.

44. Método de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de ser um método de fabricar alimentação.

45. Alimento ou alimentação, caracterizado pelo fato de ser
5 produzido pelo método como definido na reivindicação 42.

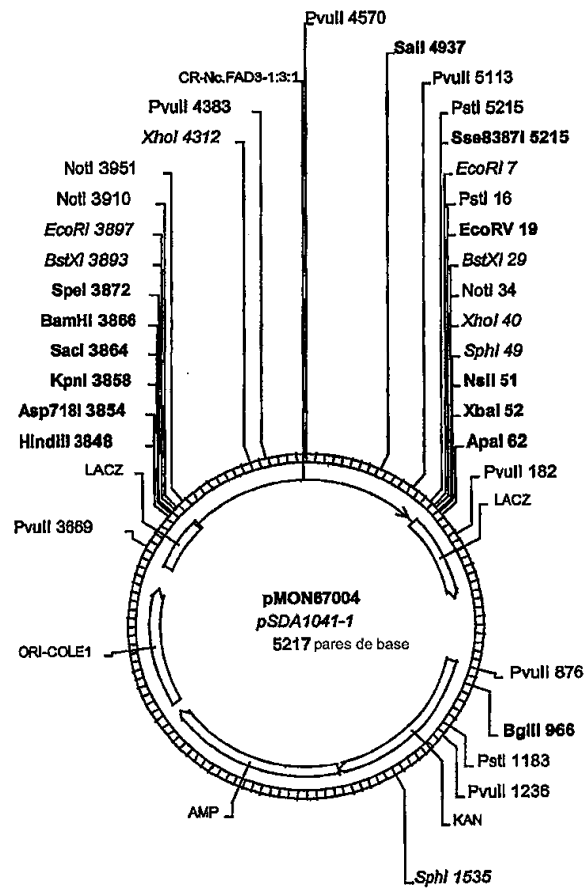


FIG. 1

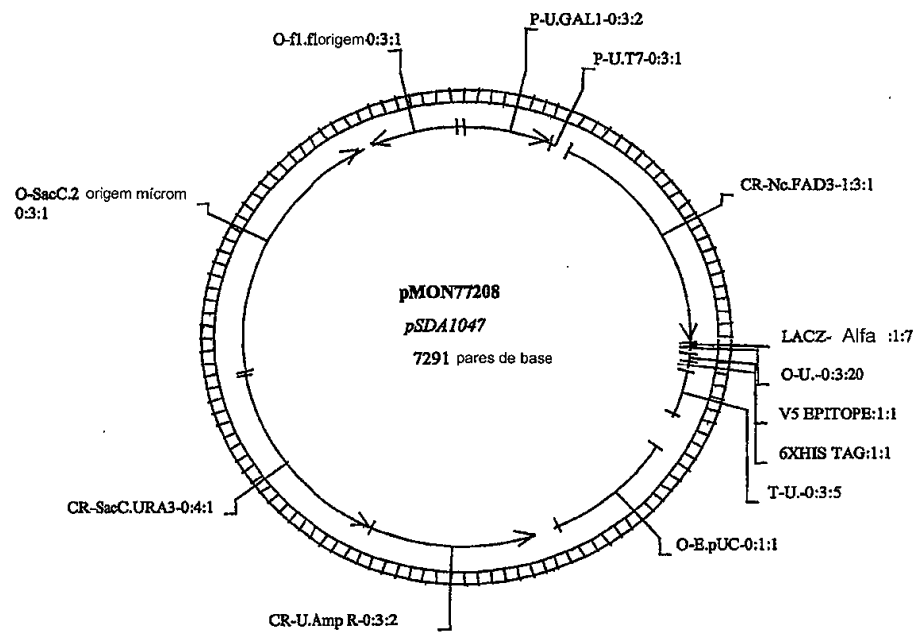
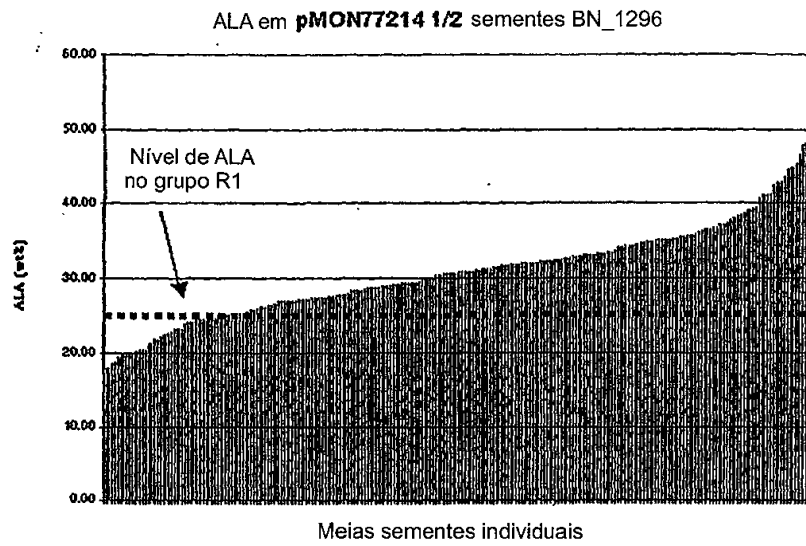
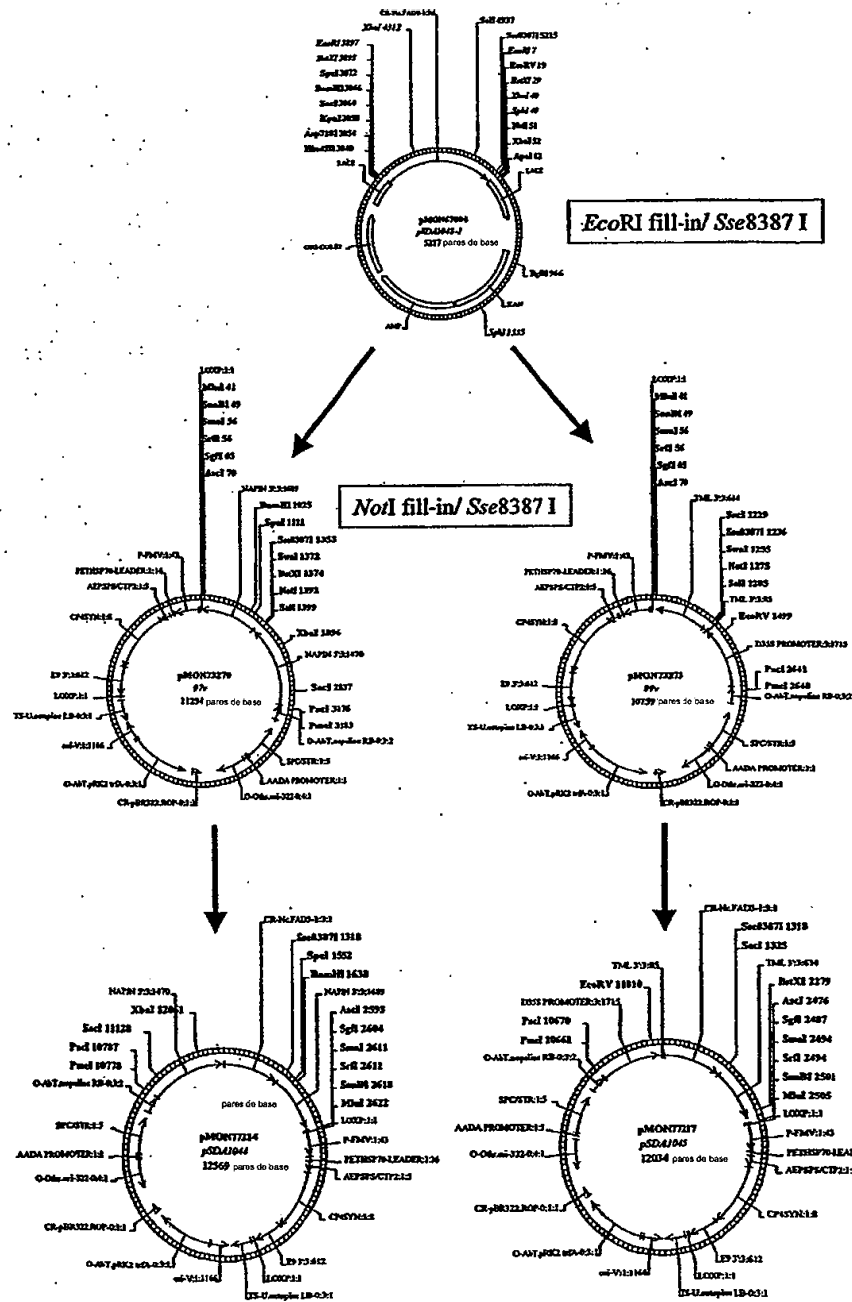


FIG. 2

**FIG. 3**



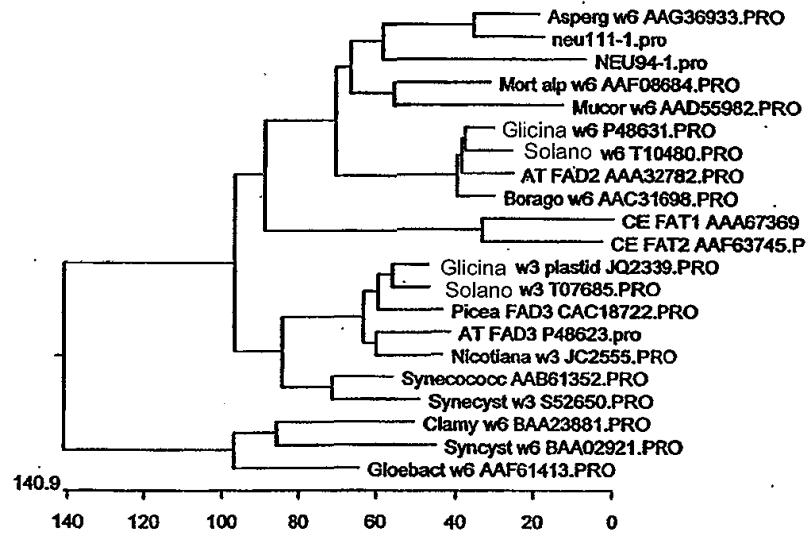


FIG. 5

[illegible]

```

Neu4 D15      243
AE 531.PRO    244
PKTS972_8130C 245
Bocryxilis cinerea 246
ANI617134     247
Ja D12.PRO    248
AFASCS        249

```

[illegible]

```

New94 D1S      275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425
AC S31.PRO    275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425
MKT5072_8130C 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425
Botrycys cinerea
AN161C17134   275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425
An D12.PRO    275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425
AFASCS        275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425

```

FIG. 6

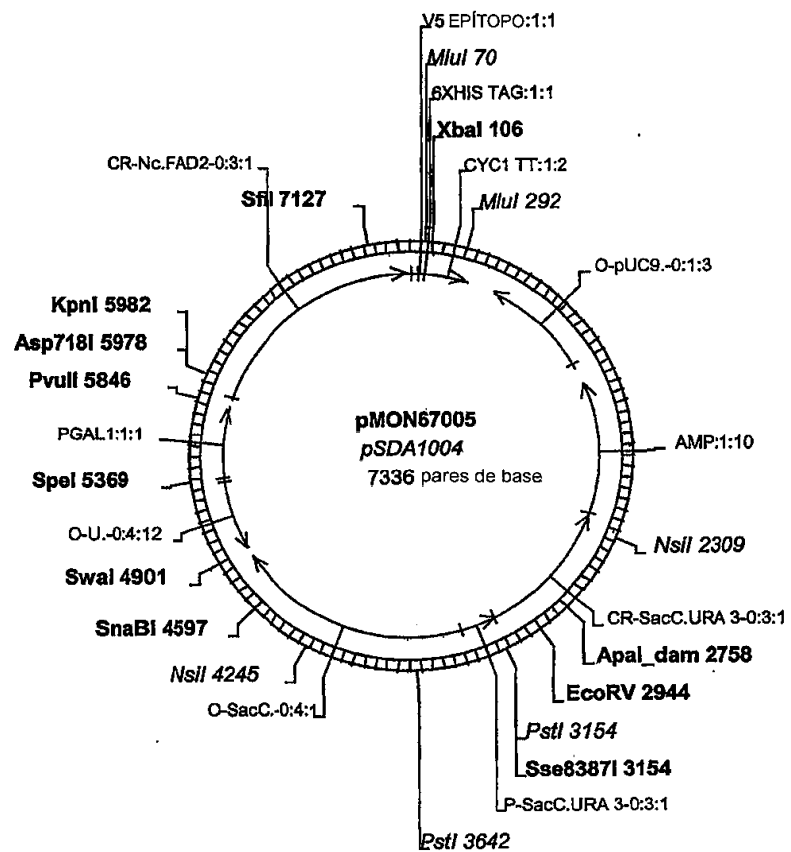


FIG. 7A

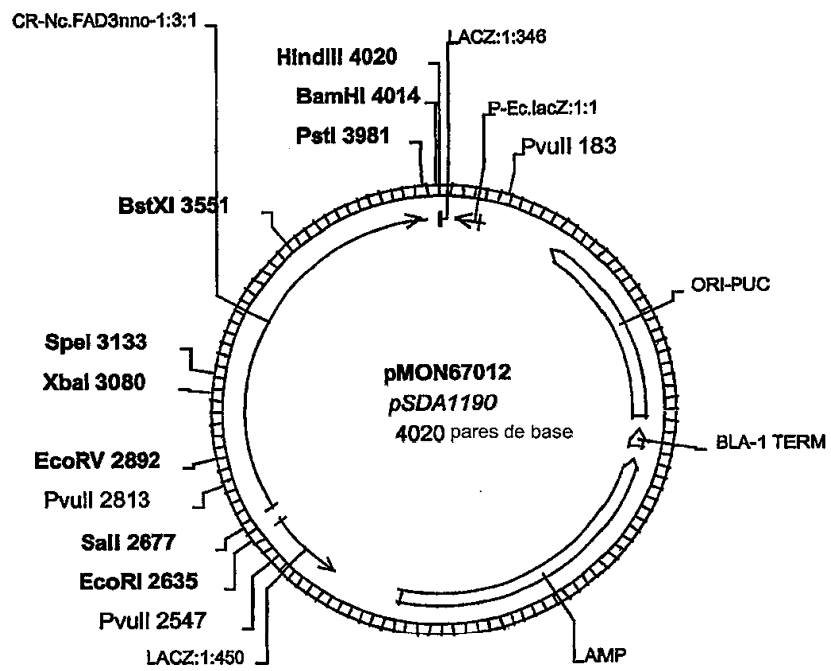


FIG. 7B

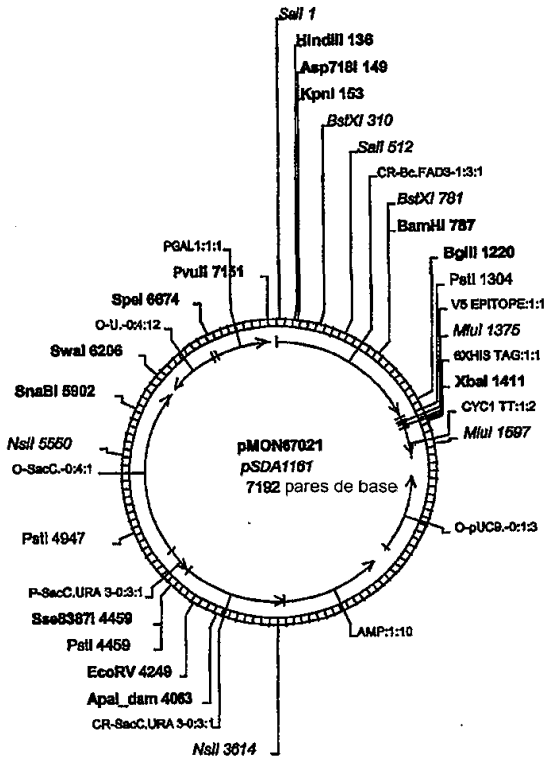


FIG. 7C

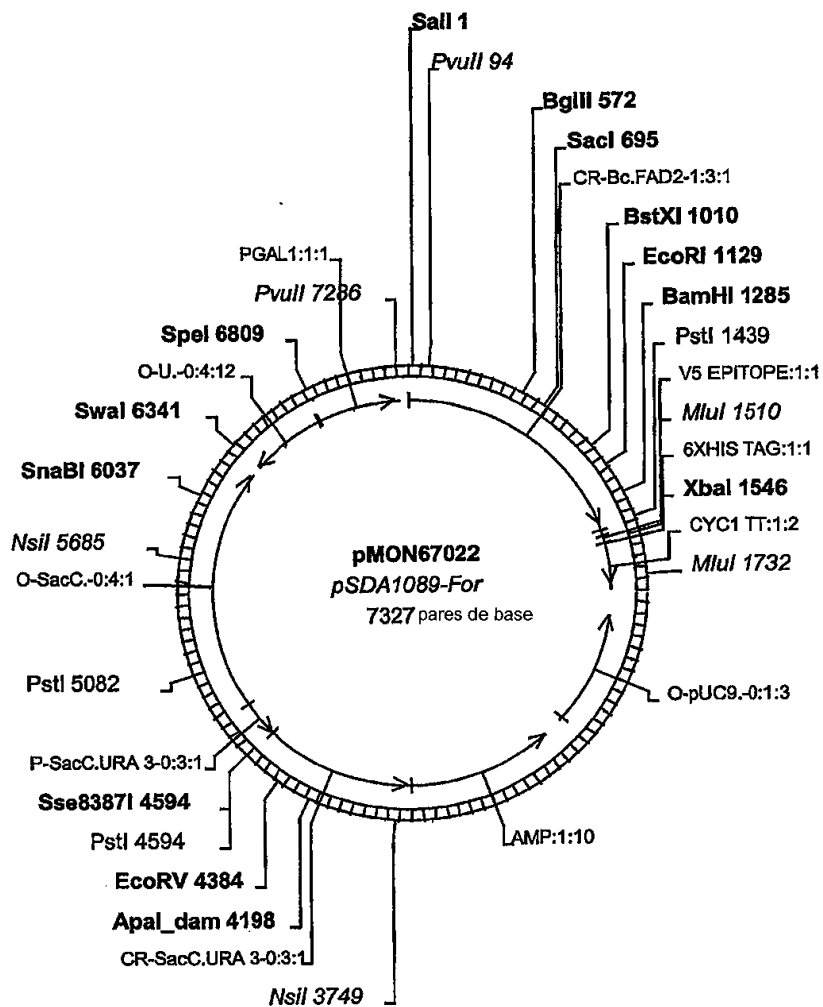


FIG. 7D

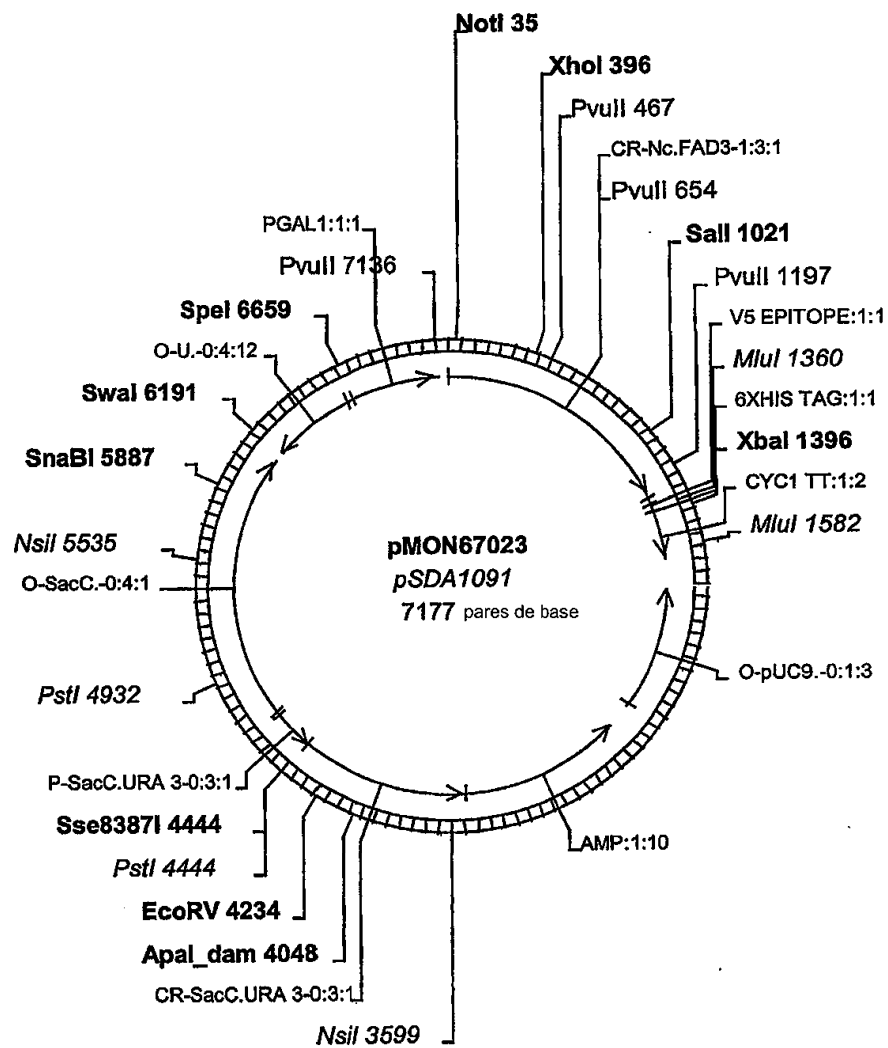


FIG. 7E

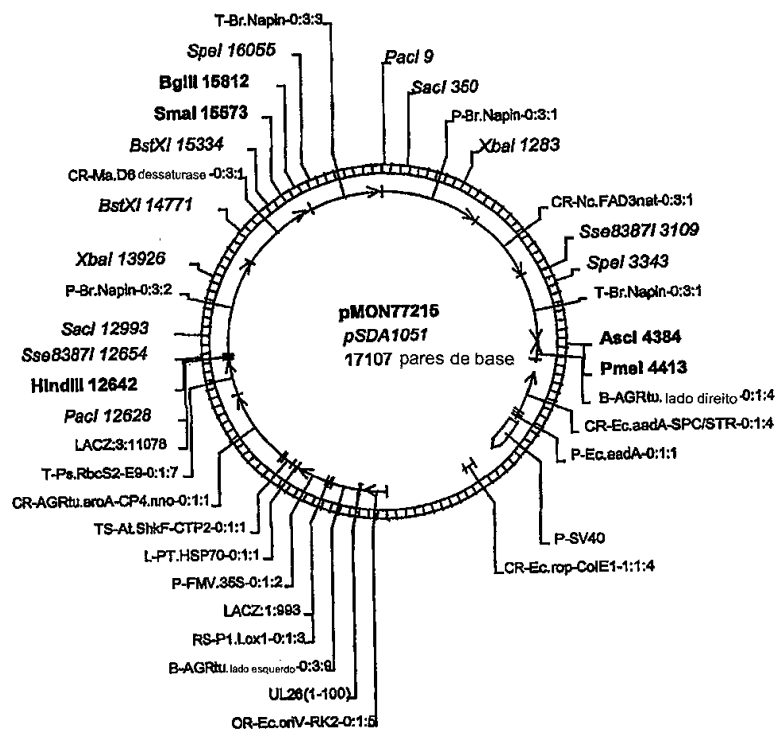


FIG. 7F

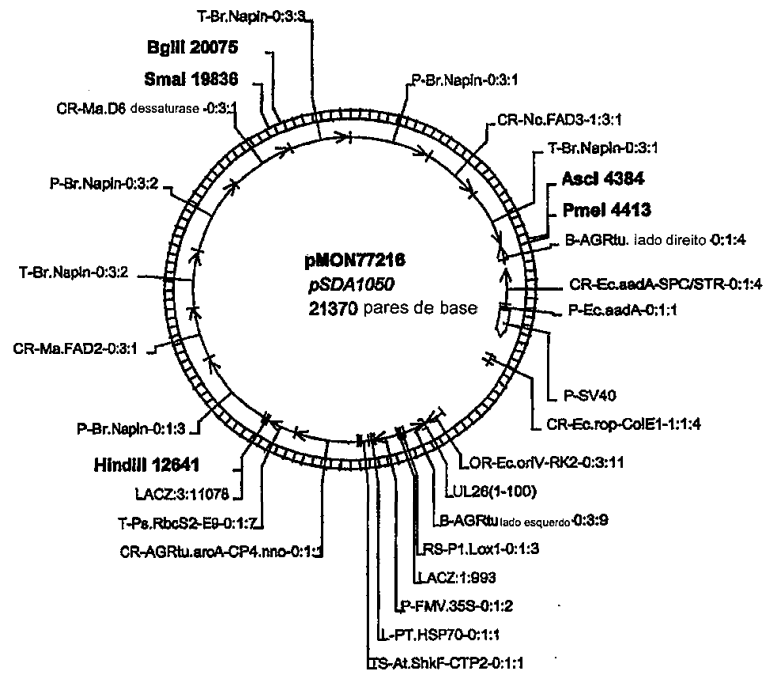


FIG. 7G