



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

(11) PI 0909611-6 B1

(22) Data do Depósito: 22/05/2009

(45) Data de Concessão: 11/09/2018



(54) Título: MÉTODO DE AUMENTO DO TEOR TOTAL DE ÁCIDO GRAXO DE UMA CÉLULA DE OLEAGINOSA, ÁCIDO NUCLEICO RECOMBINANTE, CONSTRUÇÃO DE DNA RECOMBINANTE E MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UMA SEMENTE OLEAGINOSA

(51) Int.Cl.: C12N 9/10; C12N 15/82; A01H 5/00

(30) Prioridade Unionista: 23/05/2008 US 61/055,579

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

(72) Inventor(es): KNUT MEYER; BO SHEN; CHANGJIANG LI; ERICKA BERMUDEZ; HOWARD GLENN DAMUDE; KEITH ROESLER; MITCHELL C. TARCZYNSKI

(85) Data do Início da Fase Nacional: 22/11/2010

**“MÉTODO DE AUMENTO DO TEOR TOTAL DE ÁCIDO GRAXO DE UMA
CÉLULA DE OLEAGINOSA, ÁCIDO NUCLEICO RECOMBINANTE,
CONSTRUÇÃO DE DNA RECOMBINANTE E MÉTODO DE PRODUÇÃO DE
UMA SEMENTE OLEAGINOSA”**

[001] O presente pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório Norte-Americano nº 61/055.579, depositado em 23 de maio de 2008, cujo teor é incorporado ao presente como referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção encontra-se no campo da biotecnologia, particularmente, a presente invenção se refere a sequências de polinucleotídeos que codificam genes diacilglicerol aciltransferase e ao uso dessas aciltransferases para aumento da produção de lipídios de armazenagem de sementes e perfis de ácidos graxos alterados em plantas oleaginosas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] Óleo vegetal é um recurso renovável valioso, com produção mundial anual de 145 milhões de toneladas avaliada em mais de US\$ 80 bilhões (Rupilius e Ahmad, 2007, *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 109: 433-439). São desejáveis, portanto, métodos de aumento do conteúdo e da composição de óleos vegetais. Os lipídios vegetais possuem uma série de usos industriais e nutricionais e são fundamentais para a função da membrana vegetal e a adaptação climática. Estes lipídios representam uma ampla variedade de estruturas químicas e essas estruturas determinam as propriedades industriais e fisiológicas do lipídio. Muitas dessas estruturas resultam direta ou indiretamente de processo metabólicos que alteram o grau de insaturação do lipídio. Diferentes regimes metabólicos em plantas diferentes produzem esses

lipídios alterados e a domesticação de espécies vegetais exóticas ou a modificação de espécies agronomicamente adaptadas normalmente é necessária para produzir quantidades economicamente grandes do lipídio desejado.

[004] Existem limitações para o uso de cultivo convencional de plantas para alterar a composição e o teor de ácidos graxos. O cultivo das plantas raramente revelará mutações que a) resultem em um fenótipo dominante ("ganho de função"); b) não apresentem efeitos pleiotrópicos negativos sobre o crescimento ou propriedades agronômicas; e c) encontre-se em uma enzima que exerça controle primário sobre os níveis de ácidos graxos da composição. Em casos em que fenótipos desejados são disponíveis em linhagens de milho mutantes, a sua introgressão em linhagens de elite por meio de métodos tradicionais de cultivo é cara e lenta, pois as composições de óleo desejadas provavelmente são o resultado de diversos genes recessivos.

[005] Métodos de biologia celular e molecular recentes oferecem o potencial de superação de algumas das limitações da abordagem de cultivo convencional. Algumas das tecnologias particularmente úteis são a expressão específica de sementes de genes exógenos em plantas transgênicas (vide Goldberg *et al* (1989), *Cell* 56: 149-160) e o uso de RNA sem sentido para inibir genes alvo vegetais de forma dominante e específica de tecidos (vide van der Krol *et al* (1988), *Gene* 72: 45-50). Outros avanços incluem a transferência de genes exógenos em variedades comerciais de elite de oleaginosas comerciais, tais como soja (Chee *et al* (1989), *Plant Physiol.* 91: 1212-1218; Christou *et al* (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 7500-7504; Hinchey *et al* (1988), *Bio/Technology* 6: 915-922; Publicação EPO nº 0.301.749 A2), colza (De Block *et al* (1989), *Plant Physiol.* 91: 694-701) e girassol (Everett *et al* (1987), *Bio/Technology* 5: 1201-1204), e o uso de genes como marcadores de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) em um

programa de cultivo, o que torna a introgressão de características recessivas em linhagens de elite rápida e menos cara (TanKS ley *et al* (1989), *Bio/Technology* 7: 257-264). A aplicação de cada uma dessas tecnologias requer, entretanto, a identificação e o isolamento de genes comercialmente importantes.

[006] A maior parte dos ácidos graxos torna-se esterificada em coenzima A (CoA) para gerar acil-CoAs. Essas moléculas são substratos para a síntese de glicerolípídios no retículo endoplasmático da célula, onde são produzidos ácido fosfatídico e diacilglicerol (DAG). Qualquer um desses intermediários metabólicos pode ser dirigido a fosfolípídios de membrana (tais como fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina) ou DAG pode ser dirigido para a formação de triacilgliceróis (TAGs), a reserva de armazenagem primária de lipídios em células eucarióticas.

[007] Diacilglicerol aciltransferase ("DGAT") é uma proteína de membrana integral que catalisa a etapa enzimática final na produção de triacilgliceróis em plantas, fungos e mamíferos. Esta enzima é responsável pela transferência de um grupo acila de acil-coenzima A para a posição sn-3 de 1,2-diacilglicerol ("DAG") para formar triacilglicerol ("TAG"). DGAT é associada a frações de corpo de lipídio e membrana em plantas e fungos, particularmente em oleaginosas, nas quais contribui para a armazenagem de carbono utilizado como reservas de energia. Acredita-se que TAG seja uma substância importante para a armazenagem de energia em células. DGAT é conhecida por regular a estrutura de TAG e dirigir a síntese de TAG. Além disso, sabe-se que a reação de TAG é específica para a síntese de óleo.

[008] TAG é o componente primário de óleo vegetal em plantas. Ele é utilizado pela semente como uma forma armazenada de energia a ser utilizada durante a germinação da semente.

[009] Foram identificadas duas famílias diferentes de proteínas

DGAT. A primeira família de proteínas DGAT ("DGAT1") refere-se à acil-coenzima A: colesterol aciltransferase ("ACAT") e foi descrita nas Patentes Norte-Americanas nº 6.100.077 e 6.344.548. Uma segunda família de proteínas DGAT ("DGAT2") não está relacionada com a família de DGAT1 e é descrita na Patente Norte-Americana Publicada nº WO 2004/011671, publicada em cinco de fevereiro de 2004. Outras referências a genes DGAT e seu uso em plantas incluem as Patentes PCT publicadas nº WO 2004/011.671, WO 1998/055.631 e WO 2000/001.713, bem como à Patente Norte-Americana Publicada nº 20030115632.

[010] O Pedido de Patente Publicado copendente do cessionário do depositante nº US 2006-0094088 descreve genes de DGATs de plantas e fungos e seu uso na modificação dos níveis de ácidos graxos poli-insaturados ("PUFAs") em óleos comestíveis.

[011] O Pedido PCT Publicado do cessionário do depositante nº WO 2005/003322 descreve a clonagem de fosfatidilcolina diacilglicerol aciltransferase e DGAT2 para alterar o teor de PUFA e óleo em levedura oleaginosa.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[012] A presente invenção refere-se a uma semente de soja transgênica que contém teor total de ácido graxo aumentado em pelo menos 10% em comparação com o teor total de ácido graxo de uma semente de soja segregante nula, não transgênica.

[013] Em uma segunda realização, a presente invenção refere-se a um método de aumento do teor total de ácido graxo de uma semente de soja que compreende:

(a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma ou mais construções recombinantes que contenham pelo menos uma sequência de DGAT inovadora; e

(b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) teor total de ácido graxo aumentado em pelo menos 10% em comparação com o teor total de ácido graxo de uma semente de soja segregante nula.

[014] Em uma terceira realização, a presente invenção refere-se a uma semente de milho transgênico que contém teor total de ácido graxo aumentado em pelo menos 10% em comparação com o teor total de ácido graxo de uma semente de milho segregante nula, não transgênica.

[015] Em uma quarta realização, a presente invenção refere-se a um método de aumento do teor total de ácido graxo de uma semente de milho que compreende:

(a) transformação de pelo menos uma semente de milho com uma ou mais construções recombinantes que contenham pelo menos uma sequência de DGAT inovadora; e

(b) seleção da(s) semente(s) de milho transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor total de ácido graxo aumentado em pelo menos 10% em comparação com o teor total de ácido graxo de uma semente de milho segregante nula.

[016] Em uma quinta realização, a presente invenção refere-se a uma semente de soja transgênica que contém teor total de ácido graxo de pelo menos 10% e um teor de ácido oleico aumentado em pelo menos 25% em comparação com o teor total de ácido graxo e teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula.

[017] Em uma realização adicional, a presente invenção refere-se à soja transgênica que contém teor total de ácido graxo aumentado em pelo menos 10% e pelo menos qualquer um dentre i) teor de ácido oleico aumentado em pelo menos 25%; ii) teor de ácido linolênico reduzido em pelo menos 25%; iii) teor de ácido linoleico reduzido em pelo menos 4%; iv) teor de

ácido palmítico reduzido em pelo menos 8%; e v) teor de ácido esteárico aumentado em pelo menos 14% em comparação com o teor total de ácido graxo e o teor de ácido oleico, ácido linolênico, ácido linoleico, ácido palmítico ou ácido esteárico, respectivamente, de uma semente de soja segregante nula.

[018] Em uma sexta realização, a presente invenção refere-se a um método de aumento do teor total de ácido graxo e teor de ácido oleico de uma semente de soja que compreende:

(a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma ou mais construções recombinantes que contenham pelo menos uma sequência DGAT inovadora;

(b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que possui(em) teor total de ácido graxo aumentado em pelo menos 10% e teor de ácido oleico aumentado em pelo menos 25% em comparação com o teor total de ácido graxo e o teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula.

[019] Em uma sétima realização, a presente invenção refere-se a um método de aumento do teor total de ácido graxo e redução do teor de ácido linolênico de uma semente de soja que compreende:

(a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma ou mais construções recombinantes que contenham pelo menos uma sequência de DGAT inovadora;

(b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor de ácido graxo total aumentado em pelo menos 10% e teor de ácido linolênico reduzido em pelo menos 25% em comparação com o teor total de ácido graxo e o teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula.

[020] Em uma oitava realização, a presente invenção refere-se a um método de aumento do teor total de ácido graxo e redução do teor de ácido

linoleico de uma semente de soja que compreende:

(a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma ou mais construções recombinantes que contêm pelo menos uma sequência de DGAT inovadora; e

(b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor de ácido graxo total aumentado em pelo menos 10% e teor de ácido linoleico reduzido em pelo menos 4% em comparação com o teor total de ácido graxo e o teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula.

[021] Em uma nona realização, a presente invenção refere-se a um método de aumento do teor total de ácido graxo e redução do teor de ácido palmítico de uma semente de soja que compreende:

(a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma ou mais construções recombinantes que contenham pelo menos uma sequência de DGAT inovadora; e

(b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor de ácido graxo total aumentado em pelo menos 10% e teor de ácido palmítico reduzido em pelo menos 8% em comparação com o teor total de ácido graxo e o teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula.

[022] Em uma décima realização, a presente invenção refere-se a um método de aumento do teor total de ácido graxo e do teor de ácido esteárico de uma semente de soja que compreende:

(a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma ou mais construções recombinantes que contenham pelo menos uma sequência de DGAT inovadora; e

(b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor de ácido graxo total aumentado em pelo menos 10%

e teor de ácido esteárico aumentado em pelo menos 14% em comparação com o teor total de ácido graxo e o teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula.

[023] Qualquer das sementes transgênicas de acordo com a presente invenção pode compreender uma construção recombinante que contém pelo menos uma sequência de DGAT que pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em DGAT1, DGAT2 e DGAT1 em combinação com DGAT2. Além disso, a sequência de DGAT pode ser uma sequência de DGAT de noqueira ou alterada. Adicionalmente, a sequência de DGAT pode conter substituições de aminoácidos que resultem em aumentos de óleo maiores que os atingidos com a sequência não substituída.

[024] Em uma décima primeira realização, a presente invenção refere-se a um polinucleotídeo isolado que compreende:

(a) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que possui atividade de diacilglicerol aciltransferase em que o polipeptídeo possui pelo menos 80% de identidade de aminoácidos, com base no método Clustal V de alinhamento, em comparação com uma sequência de aminoácidos conforme descrita em SEQ ID N° 8, 10 ou 12;

(b) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que possui atividade de diacilglicerol aciltransferase, em que a sequência de nucleotídeos possui pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência, com base no método BLASTN de alinhamento, em comparação com uma sequência de nucleotídeos conforme descrita em SEQ ID N° 7, 9 ou 11;

(c) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que possui atividade de diacilglicerol aciltransferase, em que a sequência de nucleotídeos hibridiza-se sob condições estridentes em uma sequência de nucleotídeos conforme descrita em SEQ ID N° 7, 9 ou 11; ou

(d) um complemento da sequência de nucleotídeos de (a), (b) ou (c), em que o complemento e a sequência de nucleotídeos consistem no mesmo número de nucleotídeos e são 100% complementares.

[025] O polinucleotídeo isolado pode ser obtido a partir de uma ou mais nozes comestíveis, tais como, mas sem limitações, avelã, noqueira, pistache e noz pecã. O polinucleotídeo isolado pode também ser parte de uma construção de DNA recombinante que compreende pelo menos uma sequência reguladora. Essa construção recombinante pode também estar compreendida em uma célula. Essa célula pode ser de uma planta oleaginosa. As plantas oleaginosas apropriadas incluem, mas sem limitações, soja, milho, canola, girassol, linho, algodão e cártamo.

[026] Em uma décima segunda realização, a presente invenção refere-se a um método de aumento do teor total de ácido graxo de uma oleaginosa, que compreende:

(a) transformação de pelo menos uma célula de oleaginosa com a construção recombinante mencionada acima;

(b) seleção da(s) célula(s) de oleaginosa transformada(s) da etapa (a) que contenha(m) um teor total de ácidos graxos aumentado em comparação com o teor total de ácido graxo de uma oleaginosa segregante nula.

[027] Também se encontra(m) dentro do escopo da presente invenção produto(s) e/ou subproduto(s) obtido(s) a partir das sementes de soja transgênica de acordo com a presente invenção.

[028] Em outro aspecto, a presente invenção refere-se a um fragmento de ácido nucleico isolado que codifica um polipeptídeo diacilglicerol aciltransferase do tipo 1 modificado, de tal forma que o polipeptídeo diacilglicerol aciltransferase do tipo 1 modificado contenha pelo menos uma substituição de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em:

- uma não alanina em uma posição correspondente à posição 12 de SEQ ID N° 12 para alanina;
- uma não prolina em uma posição correspondente à posição 30 de SEQ ID N° 12 para prolina;
- uma não alanina em uma posição correspondente à posição 31 de SEQ ID N° 12 para alanina;
- uma não serina em uma posição correspondente à posição 48 de SEQ ID N° 12 para serina;
- uma não serina em uma posição correspondente à posição 49 de SEQ ID N° 12 para serina;
- um não aspartato em uma posição correspondente à posição 51 de SEQ ID N° 12 para aspartato;
- um não aspartato em uma posição correspondente à posição 52 de SEQ ID N° 12 para aspartato;
- uma não treonina em uma posição correspondente à posição 59 de SEQ ID N° 12 para treonina;
- uma não treonina em uma posição correspondente à posição 73 de SEQ ID N° 12 para treonina;
- uma não asparagina em uma posição correspondente à posição 79 de SEQ ID N° 12 para asparagina;
- uma não leucina em uma posição correspondente à posição 118 de SEQ ID N° 12 para leucina;
- uma não alanina em uma posição correspondente à posição 123 de SEQ ID N° 12 para alanina;
- uma não valina em uma posição correspondente à posição 128 de SEQ ID N° 12 para valina;
- uma não leucina em uma posição correspondente à posição 139 de SEQ ID N° 12 para leucina;

- uma não isoleucina em uma posição correspondente à posição 155 de SEQ ID Nº 12 para isoleucina;
- uma não alanina em uma posição correspondente à posição 181 de SEQ ID Nº 12 para alanina;
- uma não serina em uma posição correspondente à posição 184 de SEQ ID Nº 12 para serina;
- uma não valina em uma posição correspondente à posição 197 de SEQ ID Nº 12 para valina;
- uma não valina em uma posição correspondente à posição 198 de SEQ ID Nº 12 para valina;
- uma não metionina em uma posição correspondente à posição 205 de SEQ ID Nº 12 para metionina;
- uma não treonina em uma posição correspondente à posição 211 de SEQ ID Nº 12 para treonina;
- uma não histidina em uma posição correspondente à posição 218 de SEQ ID Nº 12 para histidina;
- uma não valina em uma posição correspondente à posição 222 de SEQ ID Nº 12 para valina;
- uma não lisina em uma posição correspondente à posição 241 de SEQ ID Nº 12 para lisina;
- uma não valina em uma posição correspondente à posição 247 de SEQ ID Nº 12 para valina;
- uma não valina em uma posição correspondente à posição 251 de SEQ ID Nº 12 para valina;
- uma não serina em uma posição correspondente à posição 256 de SEQ ID Nº 12 para serina;
- uma não serina em uma posição correspondente à posição 257 de SEQ ID Nº 12 para serina;

- uma não fenilalanina em uma posição correspondente à posição 266 de SEQ ID Nº 12 para fenilalanina;
- uma não alanina em uma posição correspondente à posição 267 de SEQ ID Nº 12 para alanina;
- um não glutamato em uma posição correspondente à posição 281 de SEQ ID Nº 12 para glutamato;
- um não aspartato em uma posição correspondente à posição 288 de SEQ ID Nº 12 para aspartato;
- um não glutamato em uma posição correspondente à posição 293 de SEQ ID Nº 12 para glutamato;
- uma não asparagina em uma posição correspondente à posição 294 de SEQ ID Nº 12 para asparagina;
- uma não treonina em uma posição correspondente à posição 299 de SEQ ID Nº 12 para treonina;
- uma não asparagina em uma posição correspondente à posição 301 de SEQ ID Nº 12 para asparagina;
- uma não leucina em uma posição correspondente à posição 308 de SEQ ID Nº 12 para leucina;
- uma não glicina em uma posição correspondente à posição 327 de SEQ ID Nº 12 para glicina;
- uma não leucina em uma posição correspondente à posição 329 de SEQ ID Nº 12 para leucina;
- uma não leucina em uma posição correspondente à posição 334 de SEQ ID Nº 12 para leucina;
- uma não valina em uma posição correspondente à posição 337 de SEQ ID Nº 12 para valina;
- uma não valina em uma posição correspondente à posição 338 de SEQ ID Nº 12 para valina;

- uma não glutamina em uma posição correspondente à posição 356 de SEQ ID Nº 12 para glutamina;
- uma não asparagina em uma posição correspondente à posição 363 de SEQ ID Nº 12 para asparagina;
- uma não serina em uma posição correspondente à posição 390 de SEQ ID Nº 12 para serina;
- uma não valina em uma posição correspondente à posição 399 de SEQ ID Nº 12 para valina;
- uma não isoleucina em uma posição correspondente à posição 436 de SEQ ID Nº 12 para isoleucina;
- uma não alanina em uma posição correspondente à posição 451 de SEQ ID Nº 12 para alanina;
- uma não serina em uma posição correspondente à posição 457 de SEQ ID Nº 12 para serina;
- uma não metionina em uma posição correspondente à posição 475 de SEQ ID Nº 12 para metionina;
- uma não fenilalanina em uma posição correspondente à posição 486 de SEQ ID Nº 12 para fenilalanina;
- uma não isoleucina em uma posição correspondente à posição 488 de SEQ ID Nº 12 para isoleucina;
- uma não leucina em uma posição correspondente à posição 491 de SEQ ID Nº 12 para leucina;
- uma não lisina em uma posição correspondente à posição 502 de SEQ ID Nº 12 para lisina;
- uma não serina em uma posição correspondente à posição 514 de SEQ ID Nº 12 para serina;
- uma não valina em uma posição correspondente à posição 518 de SEQ ID Nº 12 para valina; e

- uma não valina em uma posição correspondente à posição 531 de SEQ ID N° 12 para valina;

em comparação com o polipeptídeo diacilglicerol aciltransferase do tipo 1 não modificado, em que a posição correspondente a uma posição de SEQ ID N° 12 é baseada em um alinhamento utilizando Clustal V de SEQ ID N° 12 e o polipeptídeo diacilglicerol aciltransferase do tipo 1 não modificado.

[029] A presente invenção também se refere a um fragmento de ácido nucleico isolado que codifica um polipeptídeo diacilglicerol aciltransferase do tipo 1 modificado, de tal forma que o polipeptídeo diacilglicerol aciltransferase do tipo 1 modificado possua pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada a partir do grupo que consiste em:

- uma não alanina em uma posição correspondente à posição 24 de SEQ ID N° 153 para alanina;

- uma não asparagina em uma posição correspondente à posição 58 de SEQ ID N° 153 para asparagina;

- uma não alanina em uma posição correspondente à posição 146 de SEQ ID N° 153 para alanina;

- uma não metionina em uma posição correspondente à posição 170 de SEQ ID N° 153 para metionina;

- uma não lisina em uma posição correspondente à posição 206 de SEQ ID N° 153 para lisina;

- uma não valina em uma posição correspondente à posição 216 de SEQ ID N° 153 para valina;

- uma não fenilalanina em uma posição correspondente à posição 231 de SEQ ID N° 153 para fenilalanina;

- um não glutamato em uma posição correspondente à posição 258 de SEQ ID N° 153 para glutamato;

- uma não treonina em uma posição correspondente à

posição 264 de SEQ ID Nº 153 para treonina;

- uma não leucina em uma posição correspondente à posição 273 de SEQ ID Nº 153 para leucina;

- uma não leucina em uma posição correspondente à posição 299 de SEQ ID Nº 153 para leucina;

- uma não valina em uma posição correspondente à posição 303 de SEQ ID Nº 153 para valina;

- uma não serina em uma posição correspondente à posição 355 de SEQ ID Nº 153 para serina;

- uma não valina em uma posição correspondente à posição 364 de SEQ ID Nº 153 para valina;

- uma não arginina em uma posição correspondente à posição 401 de SEQ ID Nº 153 para arginina;

- uma não serina em uma posição correspondente à posição 422 de SEQ ID Nº 153 para serina;

- uma não metionina em uma posição correspondente à posição 440 de SEQ ID Nº 153 para metionina;

- uma não lisina em uma posição correspondente à posição 467 de SEQ ID Nº 153 para lisina;

- uma não serina em uma posição correspondente à posição 479 de SEQ ID Nº 153 para serina;

- uma não valina em uma posição correspondente à posição 483 de SEQ ID Nº 153 para valina;

em comparação com o polipeptídeo diacilglicerol aciltransferase do tipo 1 não modificado, em que a posição correspondente a uma posição de SEQ ID Nº 153 é baseada em um alinhamento utilizando Clustal V de SEQ ID Nº 153 e o polipeptídeo diacilglicerol aciltransferase do tipo 1 não modificado.

[030] Os ácidos nucleicos isolados mencionados acima podem

ser adicionalmente utilizados em métodos de aumento do teor de ácido graxo de uma oleaginosa por meio de: 1) incorporação do ácido nucleico isolado em uma construção de DNA recombinante que compreende pelo menos um elemento regulador; 2) introdução da construção de DNA recombinante em uma célula oleaginosa e seleção de células transgênicas que contenham teor de ácido graxo aumentado em comparação com segregantes nulas, não transgênicas. As plantas produzidas por meio deste método e as plantas que incorporam a construção de DNA recombinante de acordo com a presente invenção também são reivindicadas, bem como a prole dessas plantas. Além disso, subprodutos e produtos de óleo elaborados a partir dessas plantas também são reivindicados.

[031] Em uma realização final, a presente invenção refere-se a fungos ou organismos oleaginosos microbianos, que compreendem uma construção de DNA recombinante que compreende quaisquer fragmentos de ácidos nucleicos isolados que codificam qualquer diacilglicerol aciltransferase conforme a presente invenção. Além disso, a célula fúngica pode ser, mas sem limitações, *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Lipomyces*.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS E LISTAGENS DE SEQUÊNCIAS

[032] A presente invenção pode ser compreendida mais completamente a partir da descrição detalhada a seguir e das figuras e Listagem de Sequências anexas, que fazem parte do presente pedido.

[033] A Figura 1 fornece um mapa de plasmídeos para o vetor de expressão de levedura pSZ378.

[034] A Figura 2 fornece um mapa de plasmídeos para PHP35885, que compreende DGAT CA-DGAT1-C11 inovador em vetor de expressão de leveduras.

[035] A Figura 3 fornece o teor de óleo de embriões somáticos

de soja transformados com o gene DGAT de avelã ou com quatro genes DGAT inovadores.

[036] A Figura 4 fornece o mapa de plasmídeos para PHP36707, que compreende DGAT CA-DGAT1-C11 inovador em vetor de transformação de milho.

[037] A Figura 5A-F fornece o alinhamento Clustal V de 31 sequências de DGAT1 vegetal. Certas posições de substituição de aminoácidos que geram teor de óleo mais alto em levedura e plantas são colocadas em caixas. As sequências alinhadas incluem DGAT1 de avelã (SEQ ID N° 12); DGAT1 de soja (SEQ ID N° 153); DGAT1 alterado de soja (Jall Call) (SEQ ID N° 195); DGAT1 de soja (SEQ ID N° 16); GmDGAT1 de soja (*Glycine max*) (gi56199782, SEQ ID N° 196); GmDGAT1a de soja (*Glycine max*) (gi93204650, SEQ ID N° 197); GmDGAT1b de soja (*Glycine max*) (gi93204652, SEQ ID N° 198); ZM-DGAT1 de milho (*Zea mays*) (gi187806722, SEQ ID N° 199); DGAT1 de *Arabidopsis thaliana* (gi91152592, SEQ ID N° 200); DGAT1 de uva (*Vitis vinifera*) (gi225444869, SEQ ID N° 201); DGAT1 de uva (*Vitis vinifera*) (gi147859067, SEQ ID N° 202); DGAT1 de *Vernonia galamensis* (gi157092192, SEQ ID N° 203); DGAT1 de *Vernonia galamensis* (gi157092190, SEQ ID N° 204); DGAT1 de tungue (*Vernicia fordii*) (gi86279632, SEQ ID N° 205); DGAT1 de capuchinha *Tropaeolum majus* (gi67043496, SEQ ID N° 206); DGAT1 de choupo *Populus trichocarpa* (gi224087975, SEQ ID N° 207); DGAT1 de perila branca (*Perilla frutescens*) (gi10803053, SEQ ID N° 208); DGAT1 de arroz (*Oryza sativa*) (gi57231736, SEQ ID N° 209); DGAT1 de arroz (*Oryza sativa*) (gi53791817, SEQ ID N° 210); DGAT1 de arroz (*Oryza sativa*) (gi51854436, SEQ ID N° 211); DGAT1 de azeitona (*Olea europaea*) (gi41387497, SEQ ID N° 212); DGAT1 de *Medicago truncatula* (gi124361135, SEQ ID N° 213); DGAT1 de *Lotus japonica* (gi57545061, SEQ ID N° 214); DGAT1 de *Jatropha curcas* (gi82582915, SEQ ID N° 215); DGAT1 de evônimo *Euonymus alata*

(gi118800682, SEQ ID N° 216); DGAT1 de *Brassica napus* (gi7576941, SEQ ID N° 217); DGAT1 de mostarda *Brassica juncea* (gi63376226, SEQ ID N° 218); DGAT1 de *Arabidopsis thaliana* (gi127266368, SEQ ID N° 219); DGAT1 de milho (*Zea mays*) (gi87806720, SEQ ID N° 220); DGAT1 de *Brassica napus* (gi91152589, SEQ ID N° 221); DGAT1 de *Brassica napus* (gi91152588, SEQ ID N° 222).

[038] A Figura 6 fornece plotagens da concentração de óleo contra a concentração de ácido oleico para MSE2515, MSE2516, MSE2517, MSE2518 e MSE2519 do Exemplo 8.

[039] As descrições de sequências resumem a Listagem de Sequências anexa ao presente. A Listagem de Sequências contém códigos de uma letra para caracteres de sequência de nucleotídeos e os códigos de uma e três letras para aminoácidos conforme definido nos padrões IUPAC-IUB descritos em *Nucleic Acids Research* 13: 3021-3030 (1985) e no *Biochemical Journal* 219 (2): 345-373 (1984).

RESUMO DE SEQ ID N° DE PROTEÍNAS E ÁCIDOS NUCLEICOS

Descrição e abreviação	SEQ ID N° de ácido nucleico	SEQ ID N° de proteína
Diacylglicerol aciltransferase 1a (CO-DGAT1a) de Nogueira (<i>Carya ovata</i>)	7 (1617bp)	8 (538aa)
Diacylglicerol aciltransferase 1a (CO-DGAT1b) de Nogueira (<i>Carya ovata</i>)	9 (1617bp)	10 (538aa)
Diacylglicerol aciltransferase 1 (CA-DGAT1) de avelã (<i>Corylus americana</i>)	11 (1620bp)	12 (539aa)
Plasmídeo PHP32238 que compreende DGAT1a (CO-DGAT1a) de Nogueira	13 (9074bp)	
Plasmídeo PHP32396 que compreende DGAT1b (CO-DGAT1b) de Nogueira	14 (9074bp)	
Plasmídeo PHP32395 que compreende DGAT1 (CA-DGAT1) de avelã	15 (9077bp)	
DGAT1 de soja (<i>Glycine Max</i>)		16 (504aa)
DGAT1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>		17 (520aa)
DGAT1 de trigo (<i>Triticum aestivum</i>)		18 (508aa)
DGAT1 de milho (<i>Zea mays</i>)		19 (494aa)
Plasmídeo pKS 394	20 (11696bp)	
Plasmídeo pKS 352	21 (10866bp)	
Plasmídeo pSZ378	22 (7457bp)	

Descrição e abreviação	SEQ ID Nº de ácido nucleico	SEQ ID Nº de proteína
DGAT de avelã com locais BamHI e EcoRI internos removidos (CA-DGAT1*)	23 (1620bp)	
Plasmídeo pKR52	24 (9065bp)	
CA-DGAT1-A1 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	25 (1620bp)	26 (539aa)
CA-DGAT1-A2 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	27 (1620bp)	28 (539aa)
CA-DGAT1-A9 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	29 (1620bp)	30 (539aa)
CA-DGAT1-A14 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	31 (1620bp)	32 (539aa)
CA-DGAT1-A15 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	33 (1620bp)	34 (539aa)
CA-DGAT1-A16 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	35 (1620bp)	36 (539aa)
CA-DGAT1-A17 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	37 (1620bp)	38 (539aa)
CA-DGAT1-B6 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	39 (1620bp)	40 (539aa)
CA-DGAT1-C1 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	41 (1620bp)	42 (539aa)
CA-DGAT1-C5 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	43 (1620 bp)	44 (539aa)
CA-DGAT1-C7 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	45 (1620bp)	46 (539aa)
CA-DGAT1-C8 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	47 (1620bp)	48 (539aa)
CA-DGAT1-C9 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	49 (1620bp)	50 (539aa)
CA-DGAT1-C10 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	51 (1620bp)	52 (539aa)
CA-DGAT1-C11 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	53 (1620bp)	54 (539aa)
CA-DGAT1-C13 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	55 (1620bp)	56 (539aa)
CA-DGAT1-C15 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	57 (1620bp)	58 (539aa)
CA-DGAT1-D2 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	59 (1620bp)	60 (539aa)
CA-DGAT1-D4 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	61 (1620bp)	62 (539aa)
CA-DGAT1-D5 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	63 (1620bp)	64 (539aa)
CA-DGAT1-D6 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	65 (1620bp)	66 (539aa)
CA-DGAT1-D7 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	67 (1620bp)	68 (539aa)
CA-DGAT1-D8 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	69 (1620bp)	70 (539aa)
CA-DGAT1-D9 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	71 (1620bp)	72 (539aa)
CA-DGAT1-D10 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	73 (1620bp)	74 (539aa)
CA-DGAT1-D12 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	75 (1620bp)	76 (539aa)
CA-DGAT1-D14 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	77 (1620bp)	78 (539aa)
CA-DGAT1-D15 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	79 (1620bp)	80 (539aa)
CA-DGAT1-D16 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	81 (1620bp)	82 (539aa)
CA-DGAT1-D17 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	83 (1620bp)	84 (539aa)
CA-DGAT1-D18 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	85 (1620bp)	86 (539aa)
CA-DGAT1-D19 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	87 (1620bp)	88 (539aa)
CA-DGAT1-D20 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	89 (1620bp)	90 (539aa)
CA-DGAT1-E1 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	91 (1620bp)	92 (539aa)
CA-DGAT1-E2 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	93 (1620bp)	94 (539aa)
CA-DGAT1-E3 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	95 (1620bp)	96 (539aa)
CA-DGAT1-E4 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	97 (1620bp)	98 (539aa)
CA-DGAT1-E5 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	99 (1620bp)	100 (539aa)
CA-DGAT1-E6 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	101 (1620bp)	102 (539aa)
CA-DGAT1-E7 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	103 (1620bp)	104 (539aa)

Descrição e abreviação	SEQ ID Nº de ácido nucleico	SEQ ID Nº de proteína
CA-DGAT1-E8 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	105 (1620bp)	106 (539aa)
CA-DGAT1-E9 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	107 (1620bp)	108 (539aa)
CA-DGAT1-E10 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	109 (1620bp)	110 (539aa)
CA-DGAT1-E11 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	111 (1620bp)	112 (539aa)
CA-DGAT1-E13 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	113 (1620bp)	114 (539aa)
CA-DGAT1-E15 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	115 (1620bp)	116 (539aa)
CA-DGAT1-E16 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	117 (1620bp)	118 (539aa)
CA-DGAT1-E19 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	119 (1620bp)	120 (539aa)
CA-DGAT1-F4 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	121 (1620bp)	122 (539aa)
CA-DGAT1-F8 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	123 (1620bp)	124 (539aa)
CA-DGAT1-F17 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	125 (1620bp)	126 (539aa)
CA-DGAT1-F18 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	127 (1620bp)	128 (539aa)
CA-DGAT1-F19 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	129 (1620bp)	130 (539aa)
CA-DGAT1-J1 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	131 (1620bp)	132 (539aa)
CA-DGAT1-J12 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	133 (1620bp)	134 (539aa)
CA-DGAT1-J13 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	135 (1620bp)	136 (539aa)
CA-DGAT1-J16 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	137 (1620bp)	138 (539aa)
CA-DGAT1-J21 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	139 (1620bp)	140 (539aa)
CA-DGAT1-J24 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	141 (1620bp)	142 (539aa)
CA-DGAT1-J32 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	143 (1620bp)	144 (539aa)
CA-DGAT1-J34 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	145 (1620bp)	146 (539aa)
CA-DGAT1-J37 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	147 (1620bp)	148 (539aa)
CA-DGAT1-J38 de avelã (<i>Corylus americana</i>)	149 (1620bp)	150 (539aa)
Plasmídeo PHP35885	151 (9065bp)	
GM-DGAT1 de soja (<i>Glycine max</i>)	152 (1515bp)	153 (504aa)
GM-DGAT1-C9 de soja (<i>Glycine max</i>)	154 (1515bp)	155 (504aa)
GM-DGAT1-C10 de soja (<i>Glycine max</i>)	156 (1515bp)	157 (504aa)
GM-DGAT1-C11 de soja (<i>Glycine max</i>)	158 (1515bp)	159 (504aa)
GM-DGAT1-C9C10C11 de soja (<i>Glycine max</i>)	160 (1515bp)	161 (504aa)
ZM-DGAT1 (MOD1) de milho (<i>Zea mays</i>)	162 (1485bp)	
ZM-DGAT1 (MOD2) de milho (<i>Zea mays</i>)	163 (1485bp)	164 (494aa)
ZM-DGAT1 (MOD3) de milho (<i>Zea mays</i>)	165 (1485bp)	166 (494aa)
ZM-DGAT1 (MOD4) de milho (<i>Zea mays</i>)	167 (1485bp)	168 (494aa)
ZM-DGAT1 (MOD5) de milho (<i>Zea mays</i>)	169 (1485bp)	170 (494aa)
Plasmídeo PHP40102	171 (8948bp)	
Quimera DGAT1 de milho e avelã	172 (1482bp)	173 (493aa)
Quimera DGAT1-C11 de milho e avelã	174 (1482bp)	175 (493aa)
Peptídeo 1 de DGAT de avelã		176 (15aa)
Peptídeo 2 de DGAT de milho		177 (16aa)
Plasmídeo pKR72	178 (7085bp)	
Plasmídeo pKR1466	179 (8611bp)	
Plasmídeo pKR1515	180 (8611bp)	
Plasmídeo pKR1516	181 (8611bp)	

Descrição e abreviação	SEQ ID Nº de ácido nucleico	SEQ ID Nº de proteína
Plasmídeo pKR1517	182 (8611bp)	
Plasmídeo pKR1520	183 (8611bp)	
GM-DGAT1-J16 de soja (<i>Glycine max</i>)	184 (1515bp)	185 (504aa)
GM-DGAT1-J24 de soja (<i>Glycine max</i>)	186 (1515bp)	187 (504aa)
GM-DGAT1-J32 de soja (<i>Glycine max</i>)	188 (1515bp)	189 (504aa)
GM-DGAT1-J37 de soja (<i>Glycine max</i>)	190 (1515bp)	191 (504aa)
GM-DGAT1-J16J24J32J37 de soja (<i>Glycine max</i>)	192 (1515bp)	193 (504aa)
GM-DGAT1-Jall Call de soja (<i>Glycine max</i>)	194 (1515bp)	195 (504aa)
GmDGAT1_gi56199782 de soja (<i>Glycine max</i>)		196 (498aa)
GmDGAT1a gi93204650 de soja (<i>Glycine max</i>)		197 (498aa)
GmDGAT1b_gi93204652 de soja (<i>Glycine max</i>)		198 (504aa)
ZM_DGAT1 gi187806722 de milho (<i>Zea mays</i>)		199 (494aa)
DGAT1_gi91152592 de <i>Arabidopsis thaliana</i>		200 (547aa)
DGAT1_gi225444869 de uva (<i>Vitis vinifera</i>)		201 (518aa)
DGAT1_gi147859067 de uva (<i>Vitis vinifera</i>)		202 (502aa)
DGAT1_gi157092192 de <i>Vernonia galamensis</i>		203 (517aa)
DGAT1_gi157092190 de <i>Vernonia galamensis</i>		204 (523aa)
DGAT1 gi86279632 de tungue (<i>Vernicia fordii</i>)		205 (526aa)
DGAT1 gi67043496 de <i>Tropaeolum majus</i>		206 (518aa)
DGAT1_gi224087975 de <i>Populus trichocarpa</i>		207 (446aa)
DGAT1 gi10803053 de perila branca (<i>Perilla frutescens</i>)		208 (534aa)
DGAT1_gi57231736 de arroz (<i>Oryza sativa</i>)		209 (538aa)
DGAT1_gi53791817 de arroz (<i>Oryza sativa</i>)		210 (477aa)
DGAT1_gi51854436 de arroz (<i>Oryza sativa</i>)		211 (504aa)
DGAT1_gi41387497 de oliva (<i>Olea europaea</i>)		212 (532aa)
DGAT1_gi124361135 de <i>Medicago truncatula</i>		213 (539aa)
DGAT1_gi57545061 de <i>Lotus japonica</i>		214 (511aa)
DGAT1_gi82582915 de <i>Jatropha curcas</i>		215 (521aa)
DGAT1_gi118800682 de <i>Euonymus alata</i>		216 (507aa)
DGAT1_gi7576941 de <i>Brassica napus</i>		217 (501aa)
DGAT1_gi63376226 de <i>Brassica juncea</i>		218 (503aa)
DGAT1 gi127266368 de <i>Arabidopsis thaliana</i>		219 (520aa)
DGAT1_gi187806720 de milho (<i>Zea mays</i>)		220 (494aa)
DGAT1_gi91152589 de <i>Brassica napus</i>		221 (503aa)
DGAT1_gi91152588 de <i>Brassica napus</i>		222 (341aa)

[040] SEQ ID Nº 1 a 6 correspondem aos primers (p21, p18, p33, p34, p37b e p38, respectivamente) utilizados para amplificar por PCR os dois genes DGAT1 de noz pecã (*Carya ovata*) e um de avelã (*Corylus americana*).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[041] A revelação de cada referência descrita no presente é

integralmente incorporada ao presente como referência.

[042] Da forma utilizada no presente e nas reivindicações anexas, as formas no singular “um”, “uma”, “o” e “a” incluem referência ao plural, a menos que o contexto indique claramente em contrário. Desta forma, por exemplo, referência a “uma planta” inclui uma série dessas plantas, referência a “uma célula” inclui uma ou mais células e seus equivalentes conhecidos dos técnicos no assunto e assim por diante.

[043] No contexto do presente relatório descritivo, utiliza-se uma série de termos e abreviações. São fornecidas as definições a seguir:

“quadro de leitura aberta” é abreviado ORF;

“reação em cadeia de polimerase” é abreviada PCR;

“coleção Norte-Americana de Cultivo de Tipos” é abreviada ATCC;

“acil-CoA:esterol aciltransferase” é abreviada ARE2;

“fosfolipídio:diacilglicerol aciltransferase” é abreviada PDAT;

“diacilglicerol aciltransferase” é abreviada DAG AT ou DGAT;

“diacilglicerol” é abreviado DAG;

“triacilgliceróis” são abreviados TAGs; e

“coenzima A” é abreviada CoA.

[044] A expressão “ácidos graxos” designa ácidos alifáticos de cadeia longa (ácidos alcanoicos) com comprimento de cadeia variável, de cerca de C₁₂ a C₂₂ (embora sejam conhecidos ácidos com comprimento de cadeia mais longo e mais curto). Os comprimentos de cadeia predominantes são de C₁₆ a C₂₂. A estrutura de um ácido graxo é representada por um sistema de notação simples “X:Y”, em que X é o número total de átomos de carbono (C) no ácido graxo específico e Y é o número de uniões duplas.

[045] Geralmente, ácidos graxos são classificados como saturados ou insaturados. A expressão “ácidos graxos saturados” designa os

ácidos graxos que não contêm “ligações duplas” entre a sua cadeia principal de carbono. Por outro lado, “ácidos graxos insaturados” contêm “ligações duplas” ao longo das suas cadeias principais de carbono (que se encontram mais comumente na configuração *cis*). “Ácidos graxos monoinsaturados” contêm apenas uma “ligação dupla” ao longo da cadeia principal de carbono (normalmente, por exemplo, entre o nono e o décimo átomo de carbono quanto a ácido palmitoleico (16:1) e ácido oleico (18:1)), enquanto “ácidos graxos póli-insaturados” (ou “PUFAs”) contêm pelo menos duas ligações duplas ao longo da cadeia principal de carbono (tal como entre o nono e o décimo e entre o décimo segundo e o décimo terceiro átomo de carbono para ácido linoleico (18:2); e entre o nono e o décimo, o décimo segundo e o décimo terceiro e entre o décimo quinto e o décimo sexto para ácido α -linolênico (18:3)).

[046] “Óleos microbianos” ou “óleos de células isoladas” são os óleos produzidos naturalmente por micro-organismos (tais como algas, leveduras oleaginosas e fungos filamentosos) durante a sua vida útil. O termo “óleo” designa uma substância de lipídio que é líquida a 25 °C e normalmente póli-insaturada. Por outro lado, o termo “gordura” designa uma substância de lipídio que é sólida a 25 °C e normalmente saturada.

[047] “Corpos de lipídios” designam gotículas de lipídios que normalmente são delimitadas por proteínas específicas e uma monocamada de fosfolipídio. Estas organelas são locais em que a maior parte dos organismos transporta ou armazena lipídios neutros. Acredita-se que corpos de lipídios surjam de microdomínios do retículo endoplasmático que contêm enzimas de biossíntese de TAG; e a sua síntese e o seu tamanho aparentemente são controlados por componentes de proteínas específicos.

[048] “Lipídios neutros” designam os lipídios comumente encontrados em células em corpos de lipídios como óleos e gorduras de armazenagem e são chamados desta forma porque, sob pH celular, os lipídios

não contêm grupos carregados. Geralmente, eles são completamente não polares sem afinidade para água. Lipídios neutros geralmente designam mono, di e/ou triésteres de glicerol com ácidos graxos, também denominados monoacilglicerol, diacilglicerol ou TAG, respectivamente (ou, coletivamente, acilgliceróis). Uma reação de hidrólise deve ocorrer para liberar ácidos graxos livres de acilgliceróis.

[049] Os termos “triacilglicerol”, “óleo” e “TAGs” designam lipídios neutros compostos de três resíduos acila graxos esterificados em uma molécula de glicerol (e esses termos serão utilizados de forma intercambiável ao longo do presente relatório descritivo). Esses óleos podem conter PUFAs de cadeia longa, bem como ácidos graxos saturados e insaturados mais curtos e ácidos graxos saturados com cadeia mais longa. Desta forma, “biossíntese de óleo” designa geralmente a síntese de TAGs na célula.

[050] A expressão “DAG AT” designa uma diacilglicerol aciltransferase (também conhecida como acil-CoA-diacilglicerol aciltransferase ou diacilglicerol O-aciltransferase) (EC 2.3.1.20). Esta enzima é responsável pela conversão de acil-CoA e 1,2-diacilglicerol em TAG e CoA (envolvida, portanto, na etapa terminal da biossíntese de TAG). Existem duas famílias de enzimas DAG AT: DGAT1 e DGAT2. A primeira família compartilha homologia com a família genética de acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT), enquanto a segunda família não é relacionada (Lardizabal *et al*, *J. Biol. Chem.* 276 (42): 38862-28869 (2001)).

[051] O termo “PDAT” designa uma enzima de fosfolipídio: diacilglicerol aciltransferase (EC 2.3.1.158). Esta enzima é responsável pela transferência de um grupo acila da posição *sn*-2 de um fosfolipídio para a posição *sn*-3 de 1,2-diacilglicerol, de forma a resultar em lisofosfolipídio e TAG (envolvido desta forma na etapa terminal de biossíntese de TAG). Esta enzima difere de DGAT (EC 2.3.1.20) por meio da síntese de TAG por meio de um

mecanismo independente de acil-CoA.

[052] O termo “ARE2” designa uma enzima acil-CoA: esterol aciltransferase (EC 2.3.1.26; também conhecida como uma enzima esterol éster sintase 2), que catalisa a reação a seguir: acil-CoA + colesterol = CoA + éster de colesterol.

[053] Da forma utilizada no presente, “ácido nucleico” designa um polipeptídeo e inclui polímero de fita simples ou dupla de bases desoxirribonucleotídeo ou ribonucleotídeo. Os ácidos nucleicos podem também incluir fragmentos e nucleotídeos modificados. Desta forma, as expressões “polinucleotídeo”, “sequência de ácidos nucleicos”, “sequência de nucleotídeos” ou “fragmento de ácido nucleico” são utilizadas de forma intercambiável e são um polímero de RNA ou DNA que possui fita simples ou dupla, contendo opcionalmente bases de nucleotídeos sintéticas, não naturais ou alteradas. Nucleotídeos (normalmente encontrados na sua forma de 5'-monofosfato) são denominados pela sua designação de letra única conforme segue: “A” para adenilato ou desoxiadenilato (para RNA ou DNA, respectivamente), “C” para citidilato ou deosicitidilato, “G” para guanilato ou desoxiguanilato, “U” para uridilato, “T” para deositimidilato, “R” para purinas (A ou G), “Y” para pirimidienos (C ou T), “K” para G ou T, “H” para A, C ou T, “I” para inosina e “N” para qualquer nucleotídeo.

[054] As expressões “subfragmento que é funcionalmente equivalente” e “subfragmento funcionalmente equivalente” são utilizadas de forma intercambiável no presente. Estas expressões designam uma parte ou subsequência de um fragmento de ácido nucleico isolado no qual a capacidade de alterar a expressão genética ou produzir um fenótipo é retida quer o fragmento ou subfragmento codifique ou não uma enzima ativa. O fragmento ou subfragmento pode ser utilizado, por exemplo, no projeto de genes quiméricos para produzir o fenótipo desejado em uma planta transformada.

Genes quiméricos podem ser projetados para uso em supressão ligando-se um fragmento de ácido nucleico ou seu subfragmento, codifique ou não uma enzima ativa, na orientação com ou sem sentido com relação a uma sequência promotora vegetal.

[055] A expressão “domínio conservado” ou “motivo” designa um conjunto de aminoácidos conservados em posições específicas ao longo de uma sequência alinhada de proteínas evolucionariamente relacionadas. Embora aminoácidos em outras posições possam variar entre proteínas homólogas, aminoácidos que são altamente conservados em posições específicas indicam aminoácidos que são essenciais na estrutura, estabilidade ou atividade de uma proteína. Como são identificados pelo seu alto grau de conservação em sequências alinhadas de uma família de homólogos de proteínas, eles podem ser utilizados como identificadores ou “assinaturas”, para determinar se uma proteína com uma sequência recém-determinada pertence a uma família de proteínas previamente identificada.

[056] As expressões “homologia”, “homólogo”, “substancialmente similar” e “substancialmente correspondente” são utilizadas de forma intercambiável no presente. Elas designam fragmentos de ácido nucleico em que alterações em uma ou mais bases de nucleotídeos não afetam a capacidade do fragmento de ácido nucleico de mediar a expressão genética ou produzir certo fenótipo. Estas expressões também designam modificações dos fragmentos de ácido nucleico de acordo com a presente invenção, tais como exclusão ou inserção de um ou mais nucleotídeos que não alterem substancialmente as propriedades funcionais do fragmento de ácido nucleico resultante com relação ao fragmento não modificado inicial. Compreende-se, portanto, como apreciarão os técnicos no assunto, que a presente invenção engloba mais que os exemplos de sequência específicos.

[057] Além disso, os técnicos no assunto reconhecem que

sequências de ácido nucleico substancialmente similares englobadas pela presente invenção também são definidas pela sua capacidade de hibridização (sob condições moderadamente estringentes, tais como 0,5X SSC, 0,1% SDS, 60 °C) com as sequências exemplificadas no presente, ou em qualquer parte das sequências de nucleotídeos descritas no presente e que são funcionalmente equivalentes a qualquer das sequências de ácidos nucleicos descritas no presente. As condições de estringência podem ser ajustadas para seleção de fragmentos moderadamente similares, tais como sequências homólogas de organismos com relacionamento distante, até fragmentos altamente similares, tais como genes que duplicam enzimas funcionais a partir de organismos com relacionamento próximo. Lavagens pós-hibridização determinam as condições de estringência.

[058] A expressão “hibridiza-se seletivamente” inclui referência à hibridização, sob condições de hibridização estringente, de uma sequência de ácido nucleico para uma sequência alvo de ácido nucleico especificada até um grau detectavelmente maior (tal como pelo menos duas vezes sobre o fundo) que a sua hibridização em sequências de ácido nucleico não alvo e até a exclusão substancial de ácidos nucleicos não alvo. Sequências de hibridização seletiva possuem tipicamente identidade de sequências de cerca de pelo menos 80% ou identidade de sequências de 90%, até 100% de identidade de sequências, inclusive (ou seja, totalmente complementares), entre si.

[059] A expressão “condições estringentes” ou “condições de hibridização estringente” inclui referência a condições sob as quais uma sonda hibridizar-se-á seletivamente na sua sequência alvo. Condições estringentes são dependentes de sequência e serão diferentes em circunstâncias diferentes. Controlando-se a estringência das condições de hibridização e/ou lavagem, podem ser identificadas sequências alvo que são 100% complementares à sonda (sondagem homóloga). Alternativamente, condições estringências

podem ser ajustadas para permitir alguma falta de coincidência em sequências, de tal forma que sejam detectados graus mais baixos de similaridade (sondagem heteróloga). Geralmente, uma sonda possui comprimento de menos de cerca de mil nucleotídeos, opcionalmente menos de quinhentos nucleotídeos de comprimento.

[060] Tipicamente, as condições estridentes serão aquelas em que a concentração de sais é de menos de cerca de 1,5 M de íons de Na, tipicamente concentração de cerca de 0,01 a 1,0 M de íons de Na (ou outros sais) sob pH 7,0 a 8,3 e a temperatura é de pelo menos cerca de 30 °C para sondas curtas (tais como dez a cinquenta nucleotídeos) e pelo menos cerca de 60 °C para sondas longas (tais como mais de cinquenta nucleotídeos). As condições estridentes podem também ser atingidas com a adição de agentes desestabilizantes tais como formamida. Exemplos de condições de baixa estridência incluem hibridização com uma solução tampão de 30 a 35% de formamida, 1 M de NaCl, 1% SDS (dodecil sulfato de sódio) a 37 °C e uma lavagem em 1X a 2X SSC (20X SSC = 3,0 M NaCl/0,3 M citrato trissódico) a 50 até 55 °C. Exemplos de condições de estridência moderada incluem hibridização em 40 a 45% de formamida, 1 M NaCl, 1% SDS a 37 °C e lavagem em 0,5X a 1X SSC a 55 até 60 °C. Exemplos de condições de alta estridência incluem hibridização em 50% de formamida, 1 M NaCl, 1% SDS a 37 °C e lavagem em 0,1X SSC a 60 até 65 °C.

[061] A especificidade é tipicamente a função de lavagens pós-hibridização, em que os fatores críticos são a resistência iônica e a temperatura da solução de lavagem final. Para DNA e híbridos de DNA, a T_m pode ser calculada de forma aproximada a partir da equação de Meinkoth *et al*, *Anal. Biochem.* 138: 267-284 (1984): $T_m = 81,5\text{ °C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$; em que M é a molaridade de cátions monovalentes, %GC é o percentual de nucleotídeos de guanosina e citosina no DNA, % form

é o percentual de formamida na solução de hibridização e L é o comprimento do híbrido em pares de bases. A T_m é a temperatura (sob resistência iônica e pH definidos) em que 50% de uma sequência alvo complementar hibridizam-se em uma sonda perfeitamente coincidente. A T_m é reduzida em cerca de 1 °C para cada 1% de falta de coincidência; desta forma, T_m e condições de hibridização e/ou lavagem podem ser ajustadas para hibridização em sequências com a identidade desejada. Caso se deseje sequências com $\geq 90\%$ de identidade, por exemplo, a T_m pode ser reduzida em 10 °C. Geralmente, condições estridentes são selecionadas como sendo cerca de 5 °C mais baixas que o ponto de fusão térmica (T_m) para a sequência específica e seu complemento em pH e resistência iônica definida. Condições severamente estridentes podem utilizar, entretanto, uma hibridização e/ou lavagem sob temperatura 1, 2, 3 ou 4 °C mais baixa que o ponto de fusão térmica (T_m); condições moderadamente estridentes podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 6, 7, 8, 9 ou 10 °C abaixo do ponto de fusão térmica (T_m); condições de baixa estridência podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 11, 12, 13, 14, 15 ou 20 °C abaixo do ponto de fusão térmica (T_m). Utilizando a equação, composições de hibridização e lavagem e T_m desejadas, os técnicos comuns no assunto compreenderão que variações da estridência de soluções de hibridização e/ou lavagem são descritas inerentemente. Caso o grau de falta de coincidência desejado resulte em uma T_m de menos de 45 °C (solução aquosa) ou 32 °C (solução de formamida), prefere-se aumentar a concentração de SSC de forma que possa ser utilizada uma temperatura mais alta. Um extenso guia de hibridização de ácidos nucleicos é encontrado em Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2, *Overview of Principles of Hybridization and the Strategy of Nucleic Acid Probe Assays*, Elsevier, Nova Iorque (1993); e *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2, Ausubel et

al, eds., Greene Publishing e Wiley-Interscience, Nova Iorque (1995). Condições de hibridização e/ou lavagem podem ser aplicadas por pelo menos dez, trinta, sessenta, noventa, 120 ou 240 minutos.

[062] “Identidade de sequências” ou “identidade”, no contexto de sequências de polipeptídeos ou ácidos nucleicos, designa as bases de ácido nucleico ou resíduos de aminoácidos em duas sequências que são idênticas quando alinhadas para correspondência máxima ao longo de uma janela de comparação especificada.

[063] Desta forma, “percentual de identidade de sequências” designa o valor determinado por meio da comparação de duas sequências idealmente alinhadas ao longo de uma janela de comparação, em que a parte da sequência de polinucleotídeos ou polipeptídeos na janela de comparação pode compreender adições ou exclusões (ou seja, espaços) em comparação com a sequência de referência (que não compreende adições nem exclusões) para alinhamento ideal das duas sequências. O percentual é calculado determinando-se o número de posições em que os resíduos de aminoácidos ou bases de ácidos nucleicos idênticos ocorrem nas duas sequências para gerar o número de posições coincidentes, dividindo-se o número de posições coincidentes pelo número total de posições na janela de comparação e multiplicando-se os resultados por cem para gerar o percentual de identidade de sequências. Exemplos úteis de percentuais de identidades de sequências incluem, mas sem limitar-se a 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou qualquer percentual inteiro de 50% a 100%. Estas identidades podem ser determinadas utilizando qualquer um dos programas descritos no presente.

[064] Alinhamentos de sequências e cálculos de percentual de identidade ou similaridade podem ser determinados utilizando uma série de métodos de comparação projetados para detectar sequências homólogas que

incluem, mas sem limitações, o programa MegAlign® da suíte de computação bioinformática LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison WI). Dentro do contexto do presente pedido, compreender-se-á que, ao utilizar-se software de análise de sequências para análise, os resultados da análise serão baseados nos “valores padrão” do programa indicado, a menos que especificado em contrário. Da forma utilizada no presente, “valores padrão” indicará qualquer conjunto de valores ou parâmetros carregados originalmente com o software quando inicializado pela primeira vez.

[065] O “método Clustal V de alinhamento” corresponde ao método de alinhamento marcado Clustal V (descrito por Higgins e Sharp, *CABIOS*. 5: 151-153 (1989); Higgins, D. G. *et al* (1992), *Comput. Appl. Biosci.* 8: 189-191) e encontrado no programa MegAlign® da suíte de computação bioinformática LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison WI). Para alinhamentos múltiplos, os valores padrão correspondem a PENALIDADE DO INTERVALO = 10 e PENALIDADE DO COMPRIMENTO DO INTERVALO = 10. Os parâmetros padrão para alinhamentos em pares e cálculo do percentual de identidade de sequências de proteínas utilizando o método Clustal são: COMPRIMENTO DE PALAVRA = 1, PENALIDADE DO INTERVALO = 3, VISUALIZAÇÃO DO MELHOR RESULTADO = 5 e ESPAÇAMENTO EM DIAGONAIS = 5. Para ácidos nucleicos, esses parâmetros são COMPRIMENTO DE PALAVRA = 2, PENALIDADE DO INTERVALO = 5, VISUALIZAÇÃO DO MELHOR RESULTADO = 4 e ESPAÇAMENTO EM DIAGONAIS = 4. Após alinhamento das sequências utilizando o programa Clustal V, é possível obter um “percentual de identidade” observando-se a tabela “distâncias de sequências” no mesmo programa.

[066] “Método de alinhamento BLASTN” é um algoritmo fornecido pelo Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) para comparar sequências de nucleotídeos utilizando parâmetros padrão.

[067] Os técnicos no assunto compreendem bem que muitos níveis de identidade de sequências são úteis na identificação de polipeptídeos, a partir de outras espécies, em que esses polipeptídeos possuem função ou atividade idêntica ou similar. Exemplos úteis de percentuais de identidade incluem, mas sem limitações, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou qualquer percentual inteiro de 50% a 100%. De fato, qualquer identidade de aminoácido inteira de 50% a 100% pode ser útil na descrição da presente invenção, tal como 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%. Além disso, é de interesse qualquer complemento parcial ou de comprimento total deste fragmento de nucleotídeo isolado.

[068] “Gene” indica um fragmento de ácido nucleico que expressa uma proteína específica, que inclui sequências reguladoras anteriores (sequências não codificadoras 5’) e posteriores (sequências não codificadoras 3’) à sequência de codificação. “Gene nativo” indica um gene encontrado na natureza com as suas próprias sequências reguladoras. Gene “quimérico” designa qualquer gene que não seja um gene nativo, que compreende sequências reguladoras e de codificação que não são encontradas juntas na natureza. Consequentemente, um gene quimérico pode compreender sequências reguladoras e sequências de codificação que são derivadas de diferentes fontes, ou sequências reguladoras e sequências de codificação derivadas da mesma fonte, mas dispostas de uma forma diferente da encontrada na natureza. Gene “exógeno” indica um gene normalmente não encontrado no organismo hospedeiro, mas que é introduzido no organismo hospedeiro por meio de transferência genética. Os genes exógenos podem compreender genes nativos inseridos em um organismo não nativo ou genes

quiméricos. “Transgene” é um gene que foi introduzido no genoma por meio de um procedimento de transformação.

[069] O termo “genoma”, da forma em que se aplica a uma célula vegetal, engloba não apenas DNA cromossômico encontrado no interior do núcleo, mas DNA de organelas encontrado em componentes subcelulares (tais como mitocôndrias, plastídeos) da célula.

[070] “Gene otimizado por códons” é um gene que possui a sua frequência de uso de códons projetada para imitar a frequência de uso de códons preferida da célula hospedeira.

[071] “Alelo” é uma das diversas formas alternativas de um gene que ocupa um dado local sobre um cromossomo. Quando todos os alelos presentes em um dado local sobre um cromossomo forem idênticos, aquela planta é homozigótica naquele local. Caso os alelos presentes em um dado local sobre um cromossomo sejam diferentes, aquela planta é heterozigótica naquele local.

[072] “Sequência de codificação” indica uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminoácidos específica. “Sequências reguladoras” indicam sequências de nucleotídeos localizadas acima (sequências não codificadoras 5’), na própria ou abaixo (sequências não codificadoras 3’) de uma sequência de codificação e que influenciam a transcrição, estabilidade ou processamento de RNA ou tradução da sequência de codificação associada. As sequências reguladoras podem incluir, mas sem limitações: promotores, sequências líderes de tradução, introns, sequências de reconhecimento de poliadenilação, locais de processamento de RNA, locais de união efetores e estruturas de circuito e haste.

[073] “Promotor” designa uma sequência de DNA capaz de controlar a expressão de uma sequência de codificação ou RNA funcional. A sequência promotora consiste em elementos próximos e mais distantes no

fluxo, com os últimos elementos frequentemente denominados amplificadores. Consequentemente, um “amplificador” é uma sequência de DNA que pode estimular a atividade promotora e pode ser um elemento inato do promotor ou um elemento heterólogo inserido para amplificar o nível ou a especificidade de tecido de um promotor. Os promotores podem ser derivados em sua totalidade de um gene nativo ou ser compostos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados na natureza, ou mesmo compreender segmentos de DNA sintéticos. Os técnicos no assunto compreendem que diferentes promotores podem dirigir a expressão de um gene em diferentes tecidos ou tipos de células, em diferentes estágios de desenvolvimento, ou em resposta a diferentes condições ambientais. Reconhece-se ainda que, como na maior parte dos casos as fronteiras exatas de sequências reguladoras não foram completamente definidas, fragmentos de DNA com alguma variação podem possuir atividade promotora idêntica. Os promotores que fazem com que um gene seja expresso na maior parte dos tipos de células na maior parte das vezes são comumente denominados “promotores constitutivos”. Novos promotores de diversos tipos úteis em células vegetais estão constantemente sendo descobertos; numerosos exemplos podem ser encontrados na compilação de Okamura, J. K. e Goldberg, R. B., *Biochemistry of Plants* 15: 1-82 (1989).

[074] “Sequência líder de tradução” designa uma sequência de polinucleotídeos localizada entre a sequência promotora de um gene e a sequência de codificação. A sequência líder de tradução está presente no mRNA totalmente processado acima no fluxo da sequência de início de tradução. A sequência líder de tradução pode afetar o processamento do transcrito primário em mRNA, estabilidade de mRNA ou eficiência de tradução. Foram descritos exemplos de sequências líderes de tradução (Turner, R. e Foster, G. D., *Mol. Biotechnol.* 3: 225-236 (1995)).

[075] “Sequências não-codificadoras 3’”, “término de transcrição” ou “sequências de término” designam sequências de DNA em local posterior a uma sequência de codificação e incluem sequências de reconhecimento de poliadenilação e outras sequências de codificação de sinais reguladores capazes de afetar o processamento de mRNA ou a expressão genética. O sinal de poliadenilação é normalmente caracterizado por afetar a adição de traços de ácido poliadenílico à extremidade 3’ do precursor de mRNA. O uso de diferentes sequências não-codificadoras 3’ é exemplificado por Ingelbrecht, I. L. *et al*, *Plant Cell* 1: 671-680 (1989).

[076] “Transcrito de RNA” designa o produto resultante da transcrição catalisada por RNA polimerase de uma sequência de DNA. Quando o transcrito de RNA for uma cópia complementar perfeita da sequência de DNA, ele é denominado transcrito primário. Um transcrito de RNA é denominado RNA maduro quando for uma sequência de RNA derivada do processamento pós-transcricional do transcrito primário. “RNA mensageiro” ou “mRNA” designa o RNA que não contém introns e que pode ser traduzido em proteína pela célula. “cDNA” designa um DNA que é complementar a um modelo de mRNA e sintetizado a partir dele utilizando a enzima transcriptase reversa. O cDNA pode ser de fita única ou convertido em forma de fita dupla utilizando o fragmento Klenow de DNA polimerase I. RNA “com sentido” designa transcrito de RNA que inclui o mRNA e pode ser traduzido em proteína em uma célula ou *in vitro*. “RNA sem sentido” designa um transcrito de RNA que é complementar a mRNA ou um transcrito primário alvo, no todo ou em parte, e que bloqueia a expressão de um gene alvo (Patente Norte-Americana nº 5.107.065). A complementaridade de um RNA sem sentido pode dar-se com qualquer parte do transcrito genético específico, ou seja, na sequência não codificadora 5’, sequência não codificadora 3’, introns ou na sequência de codificação. “RNA funcional” designa RNA sem sentido, RNA de ribozima ou

outro RNA que pode não ser traduzido, mas que ainda tenha efeito sobre processos celulares. As expressões “complemento” e “complemento reverso” são utilizadas de forma intercambiável no presente com relação a transcritos de mRNA e destinam-se a definir o RNA sem sentido da mensagem.

[077] A expressão “ligado operativamente” designa a associação de sequências de ácido nucleico sobre um fragmento de ácido nucleico isolado, de tal forma que a função de um seja regulada pelo outro. Um promotor é ligado operativamente a uma sequência de codificação, por exemplo, quando for capaz de regular a expressão daquela sequência de codificação (ou seja, que a sequência de codificação encontra-se sob o controle transcricional do promotor). As sequências de codificação podem ser ligadas operativamente a sequências reguladoras em orientação com sentido ou sem sentido. Em outro exemplo, as regiões de RNA complementares de acordo com a presente invenção podem ser ligadas operativamente, seja direta ou indiretamente, 5' ao mRNA alvo, ou 3' ao mRNA alvo, ou no mRNA alvo, ou uma primeira região complementar é 5' e seu complemento é 3' para o mRNA alvo.

[078] As técnicas padrão de DNA recombinante e clonagem molecular utilizadas no presente são bem conhecidas na técnica e são descritas de forma mais completa em Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989). Os métodos de transformação são bem conhecidos dos técnicos no assunto e são descritos acima.

[079] “PCR” ou “reação em cadeia de polimerase” é um método de síntese de grandes quantidades de segmentos de DNA específicos e consiste em uma série de ciclos repetitivos (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk CT). Tipicamente, o DNA de fita dupla é desnaturado por calor, os dois primers complementares às fronteiras 3' do segmento desejado são combinados sob baixa temperatura e estendidos em seguida sob temperatura

intermediária. Um conjunto destas três etapas consecutivas é denominado “ciclo”.

[080] O termo “recombinante” designa uma combinação artificial de dois outros segmentos de sequência separados de outra forma, tal como por meio de síntese química ou de manipulação de segmentos isolados de ácidos nucleicos por meio de métodos de engenharia genética.

[081] Os termos “plasmídeo”, “vetor” e “conjunto” designam um elemento cromossômico adicional que frequentemente conduz genes que não são parte do metabolismo central da célula e normalmente na forma de fragmentos de DNA de fita dupla circulares. Esses elementos podem ser sequências de reprodução autônoma, sequências de integração de genoma, sequências de fagos ou nucleotídeos, lineares ou circulares, de um RNA ou DNA de fita simples ou dupla derivado de qualquer fonte, em que uma série de sequências de nucleotídeos foi unida ou recombinada em uma construção exclusiva que é capaz de introduzir um fragmento promotor e sequência de DNA para um produto genético selecionado junto com sequência não traduzida 3' apropriada em uma célula. “Conjunto de transformação” designa um vetor específico que contém um gene exógeno e elementos adicionais ao gene exógeno que facilita a transformação de uma célula hospedeira específica. “Conjunto de expressão” designa um vetor específico que contém um gene exógeno e elementos adicionais ao gene exógeno que permitem expressão aprimorada daquele gene em um hospedeiro exógeno (ou seja, em um fragmento de ácido nucleico discreto para o qual pode ser movida uma sequência de ácido nucleico ou fragmento).

[082] As expressões “construção recombinante”, “construção de expressão”, “construção quimérica”, “construção” e “construção de DNA recombinante” são utilizadas de forma intercambiável no presente. Uma construção recombinante compreende uma combinação artificial de fragmentos

de ácidos nucleicos, tais como sequências reguladoras e de codificação que não são encontradas juntas na natureza. Uma construção quimérica pode compreender, por exemplo, sequências reguladoras e sequências de codificação que são derivadas de diferentes fontes ou sequências reguladoras e sequências de codificação derivadas da mesma fonte, mas dispostas de uma forma diferente da encontrada na natureza. Essa construção pode ser utilizada por si própria ou pode ser utilizada em conjunto com um vetor. Caso seja utilizado um vetor, a seleção de vetor depende do método que será utilizado para transformar células hospedeiras, como é bem conhecido dos técnicos no assunto. Pode-se utilizar, por exemplo, um vetor de plasmídeo. Os técnicos no assunto conhecem bem os elementos genéticos que devem estar presentes sobre o vetor a fim de transformar, selecionar e propagar com sucesso células hospedeiras que compreendem qualquer dos fragmentos de ácidos nucleicos isolados de acordo com a presente invenção. Os técnicos no assunto também reconhecerão que diferentes eventos de transformação independentes resultarão em níveis e padrões diferentes de expressão (Jones *et al*, *EMBO J.* 4: 2411-2418 (1985); De Almeida *et al*, *Mol. Gen. Genetics* 218: 78-86 (1989)) e, desta forma, diversos eventos devem ser selecionados a fim de obter linhagens que exibam o padrão e o nível de expressão desejados. Essa seleção pode ser realizada por meio de análise Southern de DNA, análise Northern de expressão de mRNA, análise de imunomanchas de expressão de proteínas ou análise fenotípica, entre outras.

[083] O termo “expressão”, da forma utilizada no presente, designa a geração de um produto terminal funcional (tal como um mRNA ou proteína (seja precursora ou madura)).

[084] O termo “introduzido” indica o fornecimento de um ácido nucleico (tal como construção de expressão) ou proteína em uma célula. Introduzido inclui referência à incorporação de um ácido nucleico em uma

célula eucariótica ou procariótica, em que o ácido nucleico pode ser incorporado ao genoma da célula e inclui referência ao fornecimento transitório de um ácido nucleico ou proteína para a célula. Introduzido inclui referência a métodos de transformação estável ou transitória, bem como cruzamento sexual. Desta forma, “introduzido” no contexto de inserção de um fragmento de ácido nucleico (tal como uma construção de expressão/construção de DNA recombinante) em uma célula, indica “transfecção”, “transformação” ou “transdução” e inclui referência à incorporação de um fragmento de ácido nucleico em uma célula eucariótica ou procariótica em que o fragmento de ácido nucleico pode ser incorporado ao genoma da célula (tal como cromossomo, plasmídeo, plastídeo ou DNA de mitocôndria), convertido em uma réplica autônoma ou expresso de forma transitória (tal como mRNA transfectado).

[085] Proteína “madura” designa um polipeptídeo processado após a tradução (ou seja, aquele do qual quaisquer pré ou pró-peptídeos presentes no produto de tradução original tenham sido removidos). Proteína “precursora” designa o produto primário de tradução de mRNA (ou seja, com pré e pró-peptídeos ainda presentes). Os pré e pró-peptídeos podem ser, mas não se limitam a sinais de localização intracelular.

[086] “Transformação estável” designa a transferência de um fragmento de ácido nucleico para o genoma de um organismo hospedeiro, incluindo os genomas nucleares e organelares, resultando em herança geneticamente estável. Por outro lado, “transformação transitória” indica a transferência de um fragmento de ácido nucleico para o núcleo, ou organela que contém DNA, de um organismo hospedeiro, resultando em expressão genética sem integração ou herança estável. Os organismos hospedeiros que contêm os fragmentos de ácidos nucleicos transformados são denominados organismos “transgênicos”.

[087] Da forma utilizada no presente, “transgênico” designa uma planta ou célula que compreende no seu genoma um polinucleotídeo heterólogo. Preferencialmente, o polinucleotídeo heterólogo é integrado de forma estável ao genoma, de tal forma que o polinucleotídeo seja passado para gerações sucessivas. O polinucleotídeo heterólogo pode ser integrado ao genoma isoladamente ou como parte de uma construção de expressão. Transgênico é utilizado no presente para incluir qualquer célula, linhagem celular, calo, tecido, parte de planta ou planta cujo genótipo tenha sido alterado pela presença de ácido nucleico heterólogo que inclui os transgênicos inicialmente alterados desta forma, bem como os criados por meio de cruzamentos sexuais ou propagação assexuada a partir do transgênico inicial. O termo “transgênico”, da forma utilizada no presente, não engloba a alteração do genoma (cromossômico ou extracromossômico) por meio de métodos de cultivo de plantas convencionais ou eventos de ocorrência natural, tais como fertilização cruzada aleatória, infecção viral não recombinante, transformação bacteriana não recombinante, transposição não recombinante ou mutação espontânea.

[088] “Inibição sem sentido” designa a produção de transcritos de RNA sem sentido capazes de suprimir a expressão da proteína alvo. “Cossupressão” designa a produção de transcritos de RNA com sentido capazes de suprimir a expressão de genes endógenos ou exógenos idênticos ou substancialmente similares (Patente Norte-Americana nº 5.231.020). Construções de cossupressão em plantas foram projetadas anteriormente concentrando-se na sobre-expressão de uma sequência de ácido nucleico que possui homologia para um mRNA endógeno, na orientação com sentido, o que resulta na redução de todo o RNA que possui homologia para a sequência sobre-expressa (Vaucheret *et al*, *Plant J.* 16: 651-659 (1998); Gura, *Nature* 404: 804-808 (2000)). A eficiência geral deste fenômeno é baixa e a extensão

da redução de RNA é amplamente variável. Trabalhos mais recentes descreveram o uso de estruturas de “grampo de cabelo” que incorporam, no todo ou em parte, uma sequência de codificação de mRNA em uma orientação complementar que resulta em uma potencial estrutura de “haste e circuito” para o RNA expresso (Patente PCT nº WO 99/53050, publicada em 21 de outubro de 1999; Patente PCT nº WO 02/00904, publicada em três de janeiro de 2002). Isso aumenta a frequência de cossupressão nas plantas transgênicas recuperadas. Uma outra variação descreve o uso de sequências virais vegetais para dirigir a supressão ou “silenciamento” de sequências de codificação de mRNA próximas (Patente PCT nº WO 98/36083, publicada em vinte de agosto de 1998). Esses dois fenômenos de cossupressão não foram elucidados mecanicamente, embora evidências genéticas tenham começado a desemaranhar esta complexa situação (Elmayan *et al*, *Plant Cell* 10: 1747-1757 (1998)).

[089] O termo “oleaginoso” designa organismos que tendem a armazenar a sua fonte de energia na forma de lipídio (Weete, em *Fungal Lipid Biochemistry*, segunda edição, Plenum, 1980). Uma classe de plantas identificadas como oleaginosas é comumente denominada plantas “com sementes produtoras de óleo”. Exemplos de plantas com sementes produtoras de óleos incluem, mas sem limitar-se a: soja (*Glycine* e *Soja sp*), linho (*Linum sp*), colza (*Brassica sp*), milho, algodão, cártamo (*Carthamus sp*) e girassol (*Helianthus sp*).

[090] Dentro de micro-organismos oleaginosos, o teor de TAG ou óleo celular geralmente segue uma curva sigmoide, em que a concentração de lipídio aumenta até atingir o máximo na fase logarítmica posterior ou estacionária inicial e, em seguida, é gradualmente reduzida durante as fases estacionária posterior e de morte (Yongmanitchai e Ward, *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 419-25 (1991)).

[091] Também são descritos no presente organismos microbianos oleaginosos produzidos por meio dos métodos descritos no presente. Isso inclui, portanto, bactérias, algas, musgos, euglenoides, fungos estramenópilos e leveduras, que compreendem no seu genoma uma construção recombinante que incorpora um ácido nucleico isolado de acordo com a presente invenção. Além disso, também são descritos lipídios e óleos obtidos a partir desses organismos oleaginosos, produtos obtidos por meio do processamento dos lipídios e óleo, uso desses lipídios e óleo em alimentos, ração animal ou aplicações industriais e/ou uso dos subprodutos em alimentos ou ração animal. Exemplos de microalgas incluem, mas sem limitações, *Rhodomonas salina*, *Cryptothecodinium cohnii*, *Chaetoceros lauderi*, *Pavlova pinguis* e *Emiliana huxleyi*. Existe atualmente grande interesse no uso de microalgas oleaginosas para a produção de óleo para biocombustíveis ou para uso como nutracêuticos ou cosméticos (Hu *et al*, 2008, *Plant J.* 54: 621-639; Waltz, 2009, *Nature Biotechnology* 27: 15-18). A abordagem de genes sobre-expressos em microalgas para aumentar a produção de óleo para aplicações em biocombustíveis está sendo explorada (Waltz, 2009, *Nature Biotechnology* 27: 15-18).

[092] A expressão “levedura oleaginosa” designa os micro-organismos classificados como leveduras fabricantes de óleo. Não é incomum que micro-organismos oleaginosos acumulem mais de cerca de 25% do seu peso de células secas na forma de óleo. Exemplos de leveduras oleaginosas incluem, mas sem limitar-se de nenhuma forma aos gêneros a seguir: *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Lipomyces*.

[093] O termo “planta” designa plantas inteiras, órgãos de plantas, tecidos de plantas, sementes, células de plantas, sementes e sua prole. As células de plantas incluem, sem limitações, células de sementes,

cultivos em suspensão, embriões, regiões meristemáticas, tecido de calo, folhas, raízes, brotos, gametófitos, esporófitos, pólen e microesporos.

[094] “Prole” compreende qualquer geração subsequente de uma planta.

[095] “Semente de soja segregante nula, não transgênica” designa uma semente ou planta quase isogênica que não contém o transgene e/ou uma planta parental utilizada no processo de transformação para obter o evento transgênico. Segregante nulas podem ser plantas ou sementes que não contenham a característica transgênica devido à segregação genética normal durante a propagação das plantas transgênicas heterozigóticas.

[096] “Semente” é a cariopse do milho, que consiste em um embrião maduro e endosperma, que são produtos de fertilização dupla. O termo “milho” representa qualquer variedade, cultivo ou população de *Zea mays* L.

[097] “Grão” compreende sementes de milho maduras produzidas por plantadores comerciais para uso em fazenda ou para venda a clientes, em ambos os casos, para fins diferentes de cultivo ou reprodução da espécie. A “semente” é a semente de milho madura produzida para fins de propagação da espécie e para venda a plantadores comerciais. Da forma utilizada no presente, os termos sementes e grãos podem ser utilizados de forma intercambiável. O “embrião” ou também denominado “gérmén” é uma planta esporofítica jovem, antes do início de um período de rápido crescimento (germinação de sementes). O embrião (gérmén) de milho contém a ampla maioria do óleo encontrado na semente. A estrutura de embrião no grão de cereal inclui o eixo embriônico e o escutelo. O “escutelo” é o cotilédone isolado de um embrião de grão de cereal, especializado para absorção do endosperma. A “aleurona” é um material proteináceo, normalmente na forma de pequenos grânulos, que ocorre na camada celular mais externa do

endosperma de milho e outros grãos.

[098] Óleo vegetal é um recurso renovável valioso, com produção mundial anual de 145 milhões de toneladas avaliadas em mais de US\$ 80 bilhões (Rupilius e Ahmad, 2007, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109: 433-439). É desejável, portanto, descobrir formas de aumentar o teor de óleo de plantas. Estudos transgênicos anteriores demonstraram que diacilglicerol aciltransferase (DGAT) desempenha papel no controle da produção de óleo em plantas.

[099] A expressão ectópica de um gene DGAT do tipo I de *Arabidopsis* em *Arabidopsis* aumentou o teor de óleo da semente (Jako *et al*, 2001, *Plant Physiology* 126: 861-874). De forma similar, a expressão ectópica de alelos de DGAT do tipo I de milho em milho aumentou o teor de óleo do embrião e da semente (Zheng *et al*, 2008, *Nature Genetics* 40: 367-372). O aumento do óleo em *Brassica napus* foi observado na forma de resultado da expressão ectópica de genes DGAT do tipo I de *Brassica napus* e *Arabidopsis* (Weselake *et al*, 2008, *J. Exper. Bot.* 59: 3543-3549) ou um gene DGAT do tipo I de agrião (Xu *et al*, 2008, *Plant Biotechnology J.* 6: 799-818). Foram também utilizados DGATs de plantas não superiores e o DGAT do tipo 2 do fungo *Umbelopsis ramanniana* aumentou o teor de óleo quando expresso em soja (Lardizabal *et al*, 2008, *Plant Physiol.* 148: 89-96).

[0100] A descoberta de enzimas de DGAT com atividade superior ou com melhores propriedades cinéticas ou reguladoras pode gerar aumentos ainda maiores do teor de óleo da planta que os atingidos anteriormente. Tecidos vegetais com teor de óleo extremamente alto podem ser boas fontes de genes DGAT que codificam enzimas com propriedades favoráveis.

[0101] “Nogueiras” e nozes comestíveis de algumas árvores e arbustos contêm teores de óleo muito altos em comparação com importantes safras oleaginosas do mundo (Gunstone *et al*, 1994, *The Lipid Handbook*,

segunda edição, Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, Londres SE1 8HN, Reino Unido, pág. 112). As nozes de avelã e noz pecã, por exemplo, contêm 62 e 70% de óleo, respectivamente. Além de altos teores de óleo, algumas nozes comestíveis também contêm óleo com alta proporção de ácido oleico. O óleo de avelã e noz pecã, por exemplo, contém 76% e 52% de ácido oleico, respectivamente (Gunstone *et al*, 1994, *The Lipid Handbook*, segunda edição, Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, Londres SE1 8HN, Reino Unido, pág. 112).

[0102] Os genes DGAT dessas espécies podem ser especialmente eficazes, portanto, em safras com alto teor de ácido oleico que contêm uma alta proporção de oleoil-CoA e dioleoil diacilglicerol como substratos durante o período de formação de óleo do desenvolvimento. É de interesse, portanto, expressar os genes DGAT obtidos de tecidos com alto teor de óleo e alto teor de ácido oleico em safras com alto teor de ácido oleico que contenham atividade de FAD2 reduzida (dessaturasse de ácido graxo delta-12), atingida por meio de cultivo da planta ou por via transgênica.

[0103] Conforme discutido nos Exemplos abaixo, foi isolado um representante do gênero de avelã *Corylus*, um cDNA de DGAT de avelã norte-americana (*Corylus americana*). O gênero de avelã *Corylus* também inclui várias outras espécies próximas que se esperaria que possuíssem DGATs com propriedades similares e alta identidade de sequências, incluindo as espécies de avelã comum (*avellana*), avelã bicuda (*cornuta*), avelã (*maxima*) e avelã turca (*colurna*), entre muitas outras.

[0104] Conforme discutido nos Exemplos abaixo, foi isolado um representante do gênero de noz pecã *Carya*, cDNAs de DGAT de *Carya ovata*. O gênero de noz pecã *Carya* também inclui muitas outras espécies próximas que se esperaria que possuíssem DGATs com propriedades similares e alta identidade de sequências, incluindo as espécies de noz pecã (*illinoensis*), pecã

de casca (*laciniosa*), pecã cabeluda (*tomentosa*), pecã (*glabra*), pecã amarga (*cordiformis*), pecã chinesa (*cathayensis*) e pecã vietnamita (*tonkinensis*), entre muitas outras.

[0105] O método descrito no presente de obtenção e teste de cDNAs de DGAT de avelã americana e noz pecã poderá também ser utilizado para obter e testar cDNAs de DGAT de outras espécies dos gêneros *Corylus* ou *Carya* ou de outras nozes comestíveis descritas em Gunstone *et al*, 1994, *The Lipid Handbook*, segunda edição, Chapman e Hall, 2-6 Boundary Row, Londres SE1 8HN, Reino Unido, pág. 112, tais como pistache (57% de óleo, 69% de oleico).

[0106] Além da obtenção de genes DGAT com propriedades desejadas a partir de fontes inovadoras tais como noqueiras, abordagens de elaboração de proteínas poderão também ser tomadas para aprimorar as propriedades cinéticas, reguladoras e outras de DGAT. Essa abordagem de elaboração de DGAT não foi completamente explorada até hoje. Foram realizadas diversas substituições de aminoácidos no DGAT de agrião, mas apenas uma dessas substituições, uma alteração de serina para alanina na posição 197, resultou em aumento da atividade específica (Xu *et al*, 2008, *Plant Biotechnology J.* 6: 799-818). Esta posição corresponde a serina 216 na sequência de DGAT de avelã de acordo com a presente invenção. Em um outro estudo, foram realizadas diversas mutações aleatórias em DGAT de *Brassica napus* e algumas enzimas que sofreram mutação aumentaram o teor de óleo em levedura (Siloto *et al*, 2009, *Plant Physiol. Biochem.* 47: 456-461). A identidade das mutações, entretanto, não foi relatada e nenhuma demonstração de aumento do óleo em um tecido vegetal como resultado de diversas substituições de aminoácidos simultâneas em DGAT foi relatada antes do presente estudo, conforme descrito no capítulo de Exemplos.

[0107] A presente invenção refere-se a uma semente de soja

transgênica que contém teor total de ácido graxo aumentado de pelo menos 10% em comparação com o teor total de ácido graxo de uma semente de soja segregante nula. Compreende-se que qualquer aumento mensurável do teor total de ácido graxo de uma transgênica sobre uma segregante nula seria útil. Esses aumentos do teor total de ácido graxo incluiriam, mas sem limitar-se a pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ou 20%.

[0108] Uma oleaginosa transgênica de acordo com a presente invenção pode compreender uma construção recombinante que contém pelo menos uma sequência de DGAT. Essa sequência de DGAT pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em DGAT1, DGAT2 e DGAT1 em combinação com DGAT2. Além disso, pelo menos uma sequência de DGAT pode ser de uma noqueira ou DGAT alterada. Exemplos de sequências de DGAT apropriadas que podem ser utilizadas para a prática da presente invenção são discutidos nos Exemplos abaixo. Podem ser mencionados SEQ ID N° 7, 9, 11, 51, 53, 137, 141, 143, 147, 156, 160, 163, 165, 167, 169, 184, 186, 188, 190, 192 e 194 da presente invenção. Os técnicos no assunto apreciarão que a presente invenção inclui, mas sem limitações, as sequências de DGAT descritas no presente.

[0109] Esse promotor de construção recombinante compreenderia diferentes componentes tais como um promotor que é uma sequência de DNA que dirige a maquinaria celular de uma planta para produzir RNA a partir da sequência de codificação contígua abaixo no fluxo (3') do promotor. A região promotora influencia a velocidade, etapa de desenvolvimento e tipo de célula em que é elaborado o transcrito de RNA do gene. O transcrito de RNA é processado para produzir mRNA que serve de modelo de tradução da sequência de RNA na sequência de aminoácidos do polipeptídeo codificado. A sequência líder não traduzida 5' é uma região do

mRNA acima no fluxo da região de codificação de proteína que pode desempenhar um papel no início e tradução do mRNA. O sinal de poliadenilação e término de transcrição 3' é uma região não traduzida abaixo no fluxo da região de codificação de proteínas que funciona na célula da planta para causar o término do transcrito de RNA e a adição de nucleotídeos de poliadenilato à extremidade 3' do RNA.

[0110] A origem do promotor selecionado para dirigir a expressão da sequência de codificação de DGAT não é importante, desde que possua atividade de transcrição suficiente para realizar a presente invenção por meio de expressão de mRNA traduzível para os fragmentos de ácido nucleico desejados no tecido hospedeiro desejado no momento certo. Promotores heterólogos ou não heterólogos (ou seja, endógenos) podem ser utilizados para a prática da presente invenção. Os promotores apropriados incluem, por exemplo, mas sem limitações: a subunidade prime alfa de promotor beta conglicinina, o promotor inibidor de tripsina Kunitz 3, o promotor de anexina, o promotor de glicinina Gy1, a subunidade beta de promotor beta conglicinina, o promotor de P34/Gly Bd m 30K, o promotor de albumina, o promotor Leg A1 e o promotor Leg A2.

[0111] O promotor de anexina, ou P34, é descrito na Patente PCT nº WO 2004/071178 (publicada em 26 de agosto de 2004). O nível de atividade do promotor de anexina é comparável com o de muitos promotores fortes conhecidos, tais como: (1) o promotor CaMV 35S (Atanassova *et al*, *Plant Mol. Biol.* 37: 275-285 (1998); Battraw e Hall, *Plant Mol. Biol.* 15: 527-538 (1990); Holtorf *et al*, *Plant Mol. Biol.* 29: 637-646 (1995); Jefferson *et al*, *EMBO J.* 6: 3901-3907 (1987); Wilmink *et al*, *Plant Mol. Biol.* 28: 949-955 (1995)); (2) os promotores de oleosina de *Arabidopsis* (Plant *et al*, *Plant Mol. Biol.* 25: 193-205 (1994); Li, dissertação de Ph.D na Universidade A&M do Texas, págs. 107-128 (1997)); (3) os promotores de proteína de extensão de ubiquitina de

Arabidopsis (Callis *et al*, *J. Biol. Chem.* 265 (21): 12486-93 (1990)); (4) um promotor de gene de ubiquitina de tomate (Rollfinke *et al*, *Gene* 211 (2): 267-76 (1998)); (5) um promotor de proteína de choque de calor de soja (Schoffl *et al*, *Mol. Gen. Genet.* 217 (2-3): 246-53 (1989)); e (6) um promotor de gene de histona H3 de milho (Atanassova *et al*, *Plant Mol. Biol.* 37 (2): 275-85 (1989)).

[0112] Uma outra característica útil do promotor de anexina é o seu perfil de expressão em sementes em desenvolvimento. O promotor de anexina é mais ativo em sementes em desenvolvimento em estágios iniciais (antes de dez dias após a polinização) e é em grande parte ocioso em estágios posteriores. O perfil de expressão do promotor de anexina é diferente de diversos promotores específicos de sementes, tais como promotores de proteína de armazenagem de sementes, que frequentemente fornecem atividade mais alta em estágios posteriores de desenvolvimento (Chen *et al*, *Dev. Genet.* 10: 112-122 (1989); Ellerstrom *et al*, *Plant Mol. Biol.* 32: 1019-1027 (1996); Keddie *et al*, *Plant Mol. Biol.* 24: 327-340 (1994); Plant *et al* (acima); Li (acima)). O promotor de anexina possui um perfil de expressão mais convencional, mas permanece distinto de outros promotores específicos de sementes conhecidos. Desta forma, o promotor de anexina será um candidato muito atraente quando se desejar a sobre-expressão ou supressão de um gene em embriões em um estágio de desenvolvimento inicial. Pode ser desejável, por exemplo, sobre-expressar um desenvolvimento de embrião inicial regulador de genes ou um gene envolvido no metabolismo antes do amadurecimento de sementes.

[0113] Após a identificação de um promotor apropriado para expressão de uma sequência de codificação de DGAT específica, o promotor é ligado operativamente em seguida em orientação com sentido utilizando meios convencionais bem conhecidos dos técnicos no assunto.

[0114] Os métodos de clonagem molecular e DNA recombinante

padrão utilizados no presente são bem conhecidos na técnica e descritos mais completamente em Sambrook, J. *et al* em *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1989 (a seguir, “Sambrook *et al*, 1989”) ou Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. e Struhl, K., Eds.; em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons: Nova Iorque, 1990 (a seguir, “Ausubel *et al*, 1990”).

[0115] Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método de aumento do teor total de ácido graxo de uma semente de soja que compreende:

- (a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma construção recombinante que contém pelo menos uma sequência de DGAT; e
- (b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém um teor total de ácido graxo aumentado em pelo menos 10% em comparação com o teor total de ácido graxo de uma semente de soja segregante nula.

[0116] Após a realização da construção recombinante, ela pode ser introduzida em seguida em uma célula de planta selecionada por meio de métodos bem conhecidos dos técnicos comuns no assunto (tais como transfecção, transformação e eletroporação). Células de plantas oleaginosas são as células de plantas preferidas. A célula de planta transformada é cultivada em seguida e regenerada sob condições apropriadas que permitem a seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) que contém um teor de ácido graxo total aumentado em pelo menos 10% em comparação com o teor total de ácido graxo de uma semente de soja segregante nula.

[0117] Essas construções recombinantes podem ser introduzidas em uma célula vegetal; ou, alternativamente, cada construção pode ser introduzida em células vegetais separadas.

[0118] A expressão em uma célula de planta pode ser realizada de forma transitória ou estável conforme descrito acima.

[0119] Também se encontram dentro do escopo da presente invenção sementes ou partes de plantas obtidas dessas plantas transformadas.

[0120] Partes de plantas incluem tecidos diferenciados e não diferenciados que incluem, sem limitações, os seguintes: raízes, hastes, brotos, folhas, pólen, sementes, tecido de tumor e várias formas de células e cultivo (tais como células isoladas, protoplastas, embriões e tecido de calo). O tecido de planta pode apresentar-se em uma planta ou em um órgão, tecido ou cultivo celular de planta.

[0121] A expressão “órgão de planta” designa tecido de planta ou um grupo de tecidos que constituem uma parte morfológica e funcionalmente distinta de uma planta. O termo “genoma” designa o seguinte: (1) o complemento completo de material genético (genes e sequências não codificadoras) que está presente em cada célula de um organismo, vírus ou organela; e/ou (2) um conjunto completo de cromossomos herdados na forma de uma unidade (haploide) de um pai.

[0122] Métodos de transformação de dicotiledôneas (principalmente utilizando *Agrobacterium tumefaciens*) e obtenção de plantas transgênicas foram publicados, entre outros, para: algodão (Patente Norte-Americana nº 5.004.863; Patente Norte-Americana nº 5.159.135); soja (Patente Norte-Americana nº 5.569.834; Patente Norte-Americana nº 5.416.011); *Brassica* (Patente Norte-Americana nº 5.463.174); amendoim (Cheng *et al*, *Plant Cell Rep.* 15: 653-657 (1996); McKently *et al*, *Plant Cell Rep.* 14: 699-703 (1995)); mamão (Ling, K. *et al*, *Bio/Technology* 9: 752-758 (1991)); e ervilhas (Grant *et al*, *Plant Cell Rep.* 15: 254-258 (1995)). Para uma análise de outros métodos comumente utilizados de transformação vegetal, vide Newell, C. A. (*Mol. Biotechnol.* 16: 53-65 (2000)). Um desses métodos de transformação

utiliza *Agrobacterium rhizogenes* (Tepfler, M. e Casse-Delbart, F., *Microbiol. Sci.* 4: 24-28 (1987)). A transformação de soja utilizando fornecimento direto de DNA foi publicada utilizando fusão de PEG (Patente PCT nº WO 92/17598), eletroporação (Chowrira, G. M. *et al*, *Mol. Biotechnol.* 3: 17-23 (1995); Christou, P. *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 3962-3966 (1987)), microinjeção e bombardeamento de partículas (McCabe, D. E. *et al*, *Bio/Technology* 6: 923 (1988); Christou *et al*, *Plant Physiol.* 87: 671-674 (1988)).

[0123] Existe uma série de métodos de regeneração de plantas a partir de tecido vegetal. O método de regeneração específico dependerá do tecido vegetal inicial e da espécie de planta específica a ser regenerada. A regeneração, desenvolvimento e cultivo de plantas a partir de transformadores de protoplastas de planta isolados ou de vários explantes transformados é bem conhecida na técnica (Weissbach e Weissbach, em: *Methods for Plant Molecular Biology* (Eds.), Acadêmico: San Diego CA (1988)). Este processo de regeneração e crescimento inclui tipicamente as etapas de seleção de células transformadas e cultivo das células individualizadas ao longo das etapas habituais de desenvolvimento embrionário ao longo do estágio de plantícula enraizada. Embriões transgênicos e sementes são regenerados de forma similar. As raízes enraizadas transgênicas resultantes são plantadas em seguida em um meio de crescimento de plantas apropriado tal como solo. Preferencialmente, as plantas regeneradas são autopolinizadas para fornecer plantas transgênicas homozigóticas. Caso contrário, o pólen obtido das plantas regeneradas sofre cruzamento com plantas cultivadas com sementes de linhagens agronomicamente importantes. Por outro lado, o pólen de plantas dessas linhagens importantes é utilizado para polinizar plantas regeneradas. Uma planta transgênica de acordo com a presente invenção que contém um polipeptídeo desejado é cultivada utilizando métodos bem conhecidos dos técnicos no assunto.

[0124] Além dos procedimentos discutidos acima, os praticantes são familiares com os materiais de recursos padrão que descrevem condições e procedimentos específicos para: a construção, manipulação e isolamento de macromoléculas (tais como moléculas de DNA, plasmídeos etc.); a geração de fragmentos de DNA recombinantes e construções de expressão recombinantes; e a seleção e isolamento de clones. Vide, por exemplo, Sambrook *et al*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor: Nova Iorque (1989); Maliga *et al*, *Methods in Plant Molecular Biology*, Cold Spring Harbor: Nova Iorque (1995); Birren *et al*, *Genome Analysis: Detecting Genes*, Vol. 1, Cold Spring Harbor: Nova Iorque (1998); Birren *et al*, *Genome Analysis: Analyzing DNA*, Vol. 2, Cold Spring Harbor: Nova Iorque (1998); *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*, eds. Clark, Springer: Nova Iorque (1997).

[0125] Exemplos de plantas oleaginosas incluem, mas sem limitações: soja, espécies de *Brassica*, girassol, milho, algodão, linho e cártamo.

[0126] Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a uma semente de milho transgênico que contém teor total de ácido graxo aumentado em pelo menos 10% em comparação com o teor total de ácido graxo de uma semente de milho segregante nula. Essa semente de milho transgênico pode compreender uma construção recombinante que contém pelo menos uma sequência de DGAT. Essa sequência de DGAT pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em DGAT1, DGAT2 ou DGAT1 em combinação com DGAT2.

[0127] Em ainda outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método de aumento do teor total de ácido graxo de uma semente de milho que compreende:

- (a) transformação de pelo menos um semente de milho com

uma construção recombinante que contém pelo menos uma sequência de DGAT; e

(b) seleção da(s) semente(s) de milho transformada(s) da etapa (a) que contém um teor de ácido graxo total aumentado em pelo menos 10% em comparação com o teor total de ácido graxo de uma semente de milho segregante nula.

[0128] A presente invenção também se refere a uma semente de soja transgênica que contém teor total de ácido graxo aumentado em pelo menos 10% e um teor de ácido oleico aumentado em pelo menos 25% em comparação com o teor total de ácido graxo e teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula. Além disso, a presente invenção refere-se ainda a uma soja transgênica que contém teor total de ácido graxo aumentado em pelo menos 10% e pelo menos qualquer um dentre i) um teor de ácido oleico aumentado em pelo menos 25%; ii) um teor de ácido linolênico reduzido em pelo menos 25%; iii) um teor de ácido linoleico reduzido em pelo menos 4%; iv) um teor de ácido palmítico reduzido em pelo menos 8%; e v) um teor de ácido esteárico aumentado em pelo menos 14% em comparação com o teor total de ácido graxo e ácido oleico, ácido linolênico, ácido linoleico, ácido palmítico ou ácido esteárico, respectivamente, de uma semente de soja segregante nula.

[0129] Em ainda outro aspecto, a presente invenção também se refere a um método de aumento do teor total de ácido graxo e teor de ácido oleico de uma semente de soja que compreende:

(a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma construção recombinante que contém pelo menos uma sequência de DGAT; e

(b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor total de ácido graxo aumentado em pelo menos 10% e teor de ácido oleico aumentado em pelo menos 25% em comparação com o

teor total de ácido graxo e teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula.

[0130] Em ainda outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método de aumento do teor total de ácido graxo e redução do teor de ácido linolênico de uma semente de soja que compreende:

- (a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma construção recombinante que contém pelo menos uma sequência de DGAT; e
- (b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor total de ácido graxo aumentado em pelo menos 10% e teor de ácido linolênico reduzido em pelo menos 25% em comparação com o teor total de ácido graxo e teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula.

[0131] Ainda novamente em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um método de aumento do teor total de ácido graxo e redução do teor de ácido linoleico de uma semente de soja que compreende:

- (a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma construção recombinante que contém pelo menos uma sequência de DGAT; e
- (b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor total de ácido graxo aumentado em pelo menos 10% e teor de ácido linoleico reduzido em pelo menos 4% em comparação com o teor total de ácido graxo e teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula.

[0132] Novamente em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um método de aumento do teor total de ácido graxo e redução do teor de ácido palmítico de uma semente de soja que compreende:

- (a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma construção recombinante que contém pelo menos uma sequência de DGAT; e
- (b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a)

que contém(êm) um teor total de ácido graxo aumentado em pelo menos 10% e teor de ácido palmítico reduzido em pelo menos 8% em comparação com o teor total de ácido graxo e teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula.

[0133] Em ainda outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método de aumento do teor total de ácido graxo e do teor de ácido esteárico de uma semente de soja que compreende:

- (a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma construção recombinante que contém pelo menos uma sequência de DGAT; e
- (b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor total de ácido graxo aumentado em pelo menos 10% e teor de ácido esteárico aumentado em pelo menos 14% em comparação com o teor total de ácido graxo e teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula.

[0134] Conforme discutido acima, qualquer uma das oleaginosas transgênicas discutidas no presente pode compreender uma construção recombinante que contém pelo menos uma sequência de DGAT. Esta sequência de DGAT pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em DGAT1, DGAT2 ou DGAT1 em combinação com DGAT2. Além disso, pelo menos uma sequência de DGAT pode ser uma sequência de noqueira ou uma sequência de DGAT alterada.

[0135] Foi relatada a transformação de monocotiledôneas utilizando eletroporação, bombardeamento de partículas e *Agrobacterium*. Transformação e regeneração vegetal foram atingidas em aspargos (Bytebier *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)* 84: 5354 (1987)); cevada (Wan e Lemaux, *Plant Physiol.* 104: 37 (1994)); *Zea mays* (Rhodes *et al*, *Science* 240: 204 (1988), Gordon-Kamm *et al*, *Plant Cell* 2: 603-618 (1990), Fromm *et al*, *Bio/Technology* 8: 833 (1990), Koziel *et al*, *Bio/Technology* 11: 194 (1993),

Armstrong *et al*, *Crop Science* 35: 550-557 (1995); aveia (Somers *et al*, *Bio/Technology* 10: 15-89 (1992)); orquídea (Horn *et al*, *Plant Cell Rep.* 7: 469 (1988)); arroz (Toriyama *et al*, *Theor. Appl. Genet.* 205: 34 (1986); Part *et al*, *Plant Mol. Biol.* 32: 1135-1148 (1996); Abedinia *et al*, *Aust. J. Plant Physiol.* 24: 133-141 (1997); Zhang e Wu, *Theor. Appl. Genet.* 76: 835 (1988); Zhang *et al*, *Plant Cell Rep.* 7: 379 (1988); Battraw e Hall, *Plant Sci.* 86: 191-202 (1992); Christou *et al*, *Bio/Technology* 9: 957 (1991)); centeio (De la Pena *et al*, *Nature* 325: 274 (1987)); cana de açúcar (Bower e Birch, *Plant J.* 2: 409 (1992)); festuca alta (Wang *et al*, *Bio/Technology* 10: 691 (1992)) e trigo (Vasil *et al*, *Bio/Technology* 10: 667 (1992); Patente Norte-Americana nº 5.631.152).

[0136] Testes de expressão genética com base na expressão transitória de construções de ácido nucleico clonadas foram desenvolvidos por meio de introdução das moléculas de ácido nucleico em células vegetais por tratamento com polietileno glicol, eletroporação ou bombardeamento de partículas (Marcotte *et al*, *Nature* 335: 454-457 (1988); Marcotte *et al*, *Plant Cell* 1: 523-532 (1989); McCarty *et al*, *Cell* 66: 895-905 (1991); Hattori *et al*, *Genes Dev.* 6: 609-618 (1992); Goff *et al*, *EMBO J.* 9: 2517-2522 (1990)).

[0137] Sistemas de expressão transitória podem ser utilizados para dissecar funcionalmente construções genéticas (vide, de forma geral, Maliga *et al*, *Methods in Plant Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Press (1995)). Compreende-se que qualquer das moléculas de ácido nucleico de acordo com a presente invenção pode ser introduzida em uma célula de planta de forma permanente ou transitória em combinação com outros elementos genéticos tais como vetores, promotores, amplificadores etc.

[0138] Além dos procedimentos discutidos acima, os praticantes são familiares com os materiais de recursos padrão que descrevem condições e procedimentos específicos de construção, manipulação e isolamento de macromoléculas (tais como moléculas de DNA, plasmídeos etc.), geração de

organismos recombinantes e a seleção e isolamento de clones (vide, por exemplo, Sambrook *et al*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1989); Maliga *et al*, *Methods in Plant Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Press (1995); Birren *et al*, *Genome Analysis: Detecting Genes*, 1, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1998); Birren *et al*, *Genome Analysis: Analyzing DNA*, 2, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1998); *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Eds. Clark, Springer, Nova Iorque (1997)).

[0139] As sementes de soja transgênica de acordo com a presente invenção podem ser processadas para gerar óleo de soja, produtos de soja e/ou subprodutos de soja.

[0140] “Produtos de soja” podem incluir, mas sem limitações, os itens relacionados na Tabela 1A.

TABELA 1A

PRODUTOS DE PROTEÍNA DE SOJA DERIVADOS DE SEMENTES DE SOJA^A

<u>Produtos de grãos de soja inteiros</u>	<u>Produtos de proteína de soja processada</u>
Grãos de soja torrados Grãos de soja assados Brotos de soja Leite de soja	Farinha com gordura total e desnatada Farelo de soja Hipocotilédones de soja Massa de soja Leite de soja Isolados de proteína de soja Concentrados de proteína de soja
Ingredientes/alimentos de soja especializados	Proteína de soja texturizada Concentrados e farinha texturizada Concentrados texturizados Isolados texturizados
Leite de soja Tofu Tempeh Miso Molho de soja Proteína vegetal hidrolisada Proteína batida	

^a Vide *Soy Protein Products: Characteristics, Nutritional Aspects and Utilization* (1987), Conselho da Proteína de Soja.

[0141] “Processamento” designa qualquer método físico-químico utilizado para obter os produtos relacionados na Tabela 1A e inclui, mas sem limitações, condicionamento a quente, transformação em flocos e moagem,

extrusão, extração de solvente ou embeбimento aquoso e extração de sementes inteiras ou parciais. Além disso, “processamento” inclui os métodos utilizados para concentrar e isolar proteína de soja a partir de sementes inteiras ou parciais, bem como os diversos métodos orientais tradicionais de preparação de produtos alimentícios de soja fermentada. Padrões e Especificações Comerciais foram estabelecidos para muitos desses produtos (vide *National Oilseed Processors Association Yearbook and Trading Rules 1991-1992*). Os produtos denominados como contendo “alto teor de proteína” ou “baixo teor de proteína” são os descritos pelas Especificações Padrão. “NSI” designa o Índice de Solubilidade de Nitrogênio conforme definido por meio do Método Ac4 41 da Sociedade Norte-Americana de Químicos de Óleo. “Solubilidade de Nitrogênio KOH” é um indicador da qualidade de massa de soja e designa a quantidade de nitrogênio solúvel em 0,036 M de KOH sob as condições descritas por Araba e Dale (1990) *Poult. Sci.* 69: 76-83). Flocos “brancos” designam cotilédones descascados e transformados em flocos que tenham sido desnatados e tratados com calor com umidade controlada para que possuíssem NSI de cerca de 85 a 90. Esta expressão pode também designar uma farinha com NSI similar que tenha sido moída até passar através de um tamanho de Peneira Padrão Norte-Americano nº 100. “Cozido” designa um produto de proteína de soja, tipicamente uma farinha, com NSI de cerca de 20 a 60. “Torrado” designa um produto de proteína de soja, tipicamente uma farinha, com NSI abaixo de 20. “Farelos” designam cotilédones descascados e desnatados que possuem um tamanho de peneira padrão norte-americano nº 10 a 80. “Concentrados de proteína de soja” designam os produtos elaborados a partir de grãos de soja desnatados e descascados por meio de três processos básicos: lixiviação ácida (cerca de pH 4,5), extração com álcool (cerca de 55 a 80%) e desnaturação da proteína com calor úmido antes da extração com água. As condições tipicamente utilizadas para preparar

concentrados de proteína de soja foram descritas por Pass ((1975) Patente Norte-Americana nº 3.897.574; Campbell *et al* (1985) em *New Protein Foods*, Ed. por Altschul e Wilcke, Academic Press, Vol. 5, Capítulo 10, *Seed Storage Proteins*, págs. 302-338). “Extrusão” designa processos por meio dos quais material (farelos, farinha ou concentrado) passa através de um auger com camisa utilizando altas pressões e temperaturas como um meio de alteração da textura do material. “Texturização” e “estruturação” designam processos de extrusão utilizados para modificar as características físicas do material. As características destes processos, que incluem extrusão termoplástica, foram descritas anteriormente (Atkinson (1970), Patente Norte-Americana nº 3.488.770, Horan (1985) em *New Protein Foods*, Ed. de Altschul e Wilcke, Academic Press, Vol. 1A, Capítulo 8, págs. 367-414). Além disso, as condições utilizadas durante o processamento por extrusão de misturas alimentícias complexas que incluem produtos de proteína de soja foram descritas anteriormente (Rokey (1983), *Feed Manufacturing Technology III*, 222-237; McCullouch, Patente Norte-Americana nº 4.454.804).

TABELA 1B

ETAPAS GENERALIZADAS DE PRODUÇÃO DE ÓLEO E SUBPRODUTOS DE SOJA

Etapa do processo	Processo	Impurezas removidas e/ou subprodutos obtidos
nº 1	semente de soja	
nº 2	extração de óleo	massa
nº 3	retirada de gordura	lecitina
nº 4	refino físico ou álcali	gomas, ácidos graxos livres, pigmentos
nº 5	lavagem com água	sabão
nº 6	lixiviação	cor, sabão, metal
nº 7	(hidrogenação)	
nº 8	(winterização)	estearina
nº 9	desodorização	ácidos graxos livres, tocoferóis, esteróis, voláteis
nº 10	produtos de óleo	

[0142] Mais especificamente, as sementes de soja são limpas,

temperadas, descascadas e transformadas em flocos, de forma a aumentar a eficiência da extração de óleo. A extração de óleo normalmente é realizada por meio de extração com solvente (tal como hexano), mas pode também ser atingida por meio de uma combinação de pressão física e/ou extração com solvente. O óleo resultante é denominado óleo bruto. O óleo bruto pode ter gordura retirada por meio da hidratação de fosfolipídios e outros complexos de lipídios polares e neutros que facilitam a sua separação da fração de triglicérides não hidratante (óleo de soja). As gomas de lecitina resultantes podem ser adicionalmente processadas para elaborar produtos de lecitina comercialmente importantes utilizados em uma série de produtos alimentícios e industriais como agentes de emulsificação e liberação (ou seja, antiaglutinantes). Óleo com gordura retirada pode ser adicionalmente refinado para remoção de impurezas (principalmente ácidos graxos livres, pigmentos e gomas residuais). O refino é realizado por meio da adição de um agente cáustico que reage com ácido graxo livre para formar sabão e hidrata fosfatídeos e proteínas no óleo bruto. Utiliza-se água para lavar traços de sabão formados durante o refino. O subproduto de sabão pode ser utilizado diretamente em alimentos animais ou acidulado para recuperar os ácidos graxos livres. A coloração é removida por meio de adsorção com uma terra lixiviadora que remove a maior parte dos compostos de clorofila e carotenoide. O óleo refinado pode ser hidrogenado, de forma a resultar em gorduras com diversas texturas e propriedades de fusão. A winterização (fracionamento) pode ser utilizada para remover estearina do óleo hidrogenado por meio de cristalização sob condições de resfriamento cuidadosamente controladas. A desodorização (principalmente por meio de destilação de vapor a vácuo) é a última etapa e é projetada para remover compostos que proporcionam odor ou aroma ao óleo. Outros subprodutos valiosos tais como tocoferóis e esteróis podem ser removidos durante o processo de desodorização. Destilado

desodorizado que contém esses subprodutos pode ser vendido para a produção de vitamina E natural e outros produtos farmacêuticos de alto valor. Gorduras e óleos refinados, lixiviados (hidrogenados, fracionados) e desodorizados podem ser embalados e vendidos diretamente ou adicionalmente processados em produtos mais especializados. Uma referência mais detalhada ao processamento de sementes de soja, produção de óleo de soja e utilização de subprodutos pode ser encontrada em Erickson, *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*, The American Oil Chemists' Society and United Soybean Board (1995). Óleo de soja é líquido à temperatura ambiente porque contém teor relativamente baixo de ácidos graxos saturados em comparação com óleos tais como coco, palma, semente de palma e manteiga de cacau.

[0143] Óleos vegetais e de micróbios que contém PUFA's que foram refinados e/ou purificados podem ser hidrogenados, de forma a resultar em gorduras com diversas texturas e propriedades de fusão. Muitas gorduras processadas (incluindo espalhantes, gorduras de confeitaria, manteigas duras, margarinas, coberturas de cozimento etc.) necessitam de vários graus de solidez à temperatura ambiente e podem apenas ser produzidos por meio de alteração das propriedades físicas do óleo fonte. Isso é mais comumente atingido por meio de hidrogenação catalítica.

[0144] Hidrogenação é uma reação química na qual se adiciona hidrogênio às ligações duplas de ácidos graxos insaturados com o auxílio de um catalisador tal como níquel. Óleo de soja com alto teor oleico, por exemplo, contém ácidos graxos oleico, linoleico e linolênico insaturados e cada um deles pode ser hidrogenado. A hidrogenação possui dois efeitos primários. Em primeiro lugar, a estabilidade oxidativa do óleo aumenta como resultado da redução do teor de ácido graxo insaturado. Em segundo lugar, as propriedades físicas do óleo são alteradas porque as modificações de ácidos graxos

aumentam o ponto de fusão, resultando em uma gordura semilíquida ou sólida à temperatura ambiente.

[0145] Existem diversas variáveis que afetam a reação de hidrogenação que, por sua vez, alteram a composição do produto final. Condições de operação que incluem pressão, temperatura, tipo de catalisador e concentração, agitação e projeto de reator encontram-se entre os parâmetros mais importantes que podem ser controlados. Podem ser utilizadas condições de hidrogenação seletivas para hidrogenar os ácidos graxos mais insaturados em preferência sobre os menos insaturados. Emprega-se frequentemente hidrogenação muito leve ou rápida para aumentar a estabilidade de óleos líquidos. Hidrogenação adicional converte um óleo líquido em uma gordura fisicamente sólida. O grau de hidrogenação depende das características de fusão e desempenho desejadas projetadas para o produto final específico. Coberturas líquidas (utilizadas na fabricação de produtos de cozimento, gorduras sólidas e coberturas empregadas para operações comerciais de fritura e torração) e estoques base para fabricação de margarina encontram-se entre a série de produtos de gordura e óleo possíveis atingidos por meio de hidrogenação. Uma descrição mais detalhada de hidrogenação e produtos hidrogenados pode ser encontrada em Patterson, H. B. W., *Hydrogenation of Fats and Oils: Theory and Practice*, Sociedade Norte-Americana de Químicos de Óleo (1994).

[0146] Óleos hidrogenados tornaram-se um tanto controversos devido à presença de isômeros de ácidos graxos *trans* resultantes do processo de hidrogenação. A ingestão de grandes quantidades de isômeros *trans* foi relacionada a efeitos prejudiciais à saúde que incluem razões mais altas entre lipoproteínas de baixa densidade e de alta densidade no plasma sanguíneo e aumento do risco de doenças cardíacas coronarianas.

[0147] Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um

polinucleotídeo isolado que compreende:

a. uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que possui atividade de diacilglicerol aciltransferase em que o polipeptídeo possui pelo menos 80% de identidade de aminoácidos, com base no método Clustal V de alinhamento, em comparação com uma sequência de aminoácidos conforme descrito em SEQ ID N° 8, 10 ou 12;

b. uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que possui atividade de diacilglicerol aciltransferase, em que a sequência de nucleotídeos possui identidade de sequências de pelo menos 80%, com base no método BLASTN de alinhamento, em comparação com uma sequência de nucleotídeos conforme descrito em SEQ ID N° 7, 9 ou 11;

c. uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que possui atividade de diacilglicerol aciltransferase, em que a sequência de nucleotídeos hibridiza-se sob condições estridentes em uma sequência de nucleotídeos conforme descrito em SEQ ID N° 7, 9 ou 11; ou

d. um complemento da sequência de nucleotídeos de a, b ou c, em que o complemento e a sequência de nucleotídeos consistem no mesmo número de nucleotídeos e são 100% complementares.

[0148] O polinucleotídeo isolado pode ser obtido a partir de uma ou mais nozes comestíveis, tais como, mas sem limitações, avelã, noqueira, pistache e noz pecã. O polinucleotídeo isolado pode também ser parte de uma construção de DNA recombinante que compreende pelo menos uma sequência reguladora. Essa construção recombinante pode também estar compreendida em uma célula. Essa célula pode ser de uma planta oleaginosa. As plantas oleaginosas apropriadas incluem, mas sem limitações, soja, milho, canola, girassol, linho, algodão e cártamo.

[0149] Em um aspecto adicional, a presente invenção refere-se a um método de aumento do teor total de ácido graxo de uma oleaginosa que

compreende:

- a. transformação de pelo menos uma célula oleaginosa com a construção recombinante mencionada acima; e
- b. seleção da(s) célula(s) oleaginosa(s) transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor total de ácido graxo aumentado em comparação com o teor total de ácido graxo de uma oleaginosa segregante nula.

[0150] Sequências de polinucleotídeos produzidas por meio de métodos de geração de diversidade ou métodos de recombinação de sequências recursivas ("RSR") (tais como alteração de DNA) que podem ser realizadas *in vitro*, *in vivo*, *in silico* ou sua combinação são uma característica da presente invenção. Um método de diversificação pode incluir a recombinação recursiva de uma ou mais sequências de nucleotídeos de acordo com a presente invenção conforme descrito abaixo com um ou mais nucleotídeos adicionais. As etapas de recombinação são opcionalmente realizadas *in vivo*, *ex vivo*, *in silico* ou *in vitro*. Esta geração de diversidade ou recombinação de sequências recursivas produz pelo menos uma biblioteca de polipeptídeos DGAT modificados recombinantes. Os polipeptídeos codificados por membros dessa biblioteca são incluídos na presente invenção. Esses polipeptídeos podem ser indicados, mas sem limitações, por expressões tais como "DGATs alterados", "diacilglicerol aciltransferase do tipo I modificada", "DGATs modificados" ou "sequências de DGAT que contêm substituições de aminoácidos que resultam em aumentos de óleo".

[0151] Os DGATs de acordo com a presente invenção podem ser facilmente modificados utilizando métodos que são bem conhecidos na técnica para aprimorar ou alterar a atividade de DGAT. Diversos protocolos de geração de diversidade são disponíveis e descritos na técnica. Os procedimentos podem ser utilizados separadamente e/ou em combinação para produzir uma

ou mais variantes de um ácido nucleico ou um conjunto de ácidos nucleicos, bem como variantes de proteínas codificadas. Individual e coletivamente, esses procedimentos fornecem formas robustas e amplamente aplicáveis de geração de ácidos nucleicos diversificados e conjuntos de ácidos nucleicos (incluindo bibliotecas de ácidos nucleicos) que são úteis para a elaboração ou rápida evolução de ácidos nucleicos, proteínas, processos, células e/ou organismos com características novas e/ou aprimoradas.

[0152] Embora sejam realizadas distinções e classificações ao longo do presente relatório descritivo para maior clareza, apreciar-se-á que os métodos frequentemente não são mutuamente exclusivos. De fato, os vários métodos podem ser utilizados isoladamente ou em combinação, em paralelo ou em série, para acesso a diversas variantes de sequências.

[0153] O resultado de qualquer um dos procedimentos de geração de diversidade descritos no presente pode ser a geração de um ou mais ácidos nucleicos, que podem ser selecionados para ácidos nucleicos que codificam proteínas com propriedades desejáveis ou que as conferem. Após a diversificação por meio de um ou mais dos métodos do presente, ou outro disponível para os técnicos no assunto, quaisquer ácidos nucleicos que são produzidos podem ser selecionados por uma atividade ou propriedade desejada, tal como atividade de DGAT. Diversas propriedades relacionadas (ou mesmo não relacionadas) podem ser avaliadas, em série ou em paralelo, a critério do praticante.

[0154] Descrições de uma série de procedimentos de geração de diversidade, incluindo alteração de múltiplos genes e métodos de geração de sequências de ácidos nucleicos modificadas que codificam diversos domínios enzimáticos, são encontradas, por exemplo, nas publicações a seguir e nas referências ali mencionadas: Soong, N. *et al* (2000), *Molecular Breeding of Viruses*, *Nat. Genet.* 25 (4): 436-39; Stemmer *et al* (1999), *Molecular Breeding*

of Viruses for Targeting and Other Clinical Properties, *Tumor Targeting* 4: 1-4; Ness et al (1999), *DNA Shuffling of Subgenomic Sequences of Subtilisin*, *Nature Biotechnology* 17: 893-896; Chang et al (1999), *Evolution of a Cytokine Using DNA Family Shuffling*, *Nature Biotechnology* 17: 793-797; Minshull e Stemmer (1999), *Protein Evolution by Molecular Breeding*, *Current Opinion in Chemical Biology* 3: 284-290; Christians et al (1999), *Directed Evolution of Thymidine Kinase for AZT Phosphorylation Using DNA Family Shuffling*, *Nature Biotechnology* 17: 259-264; Crameri et al (1998), *DNA Shuffling of a Family of Genes from Diverse Species Accelerates Directed Evolution*, *Nature* 391: 288-291; Crameri et al (1997), *Molecular Evolution of an Arsenate Detoxification Pathway by DNA Shuffling*, *Nature Biotechnology* 15: 436-438; Zhang et al (1997), *Directed Evolution of an Effective Fucosidase from a Galactosidase by DNA Shuffling and Screening*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 4504-4509; Patten et al (1997), *Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines*, *Current Opinion in Biotechnology* 8: 724-733; Crameri et al (1996), *Construction and Evolution of Antibody-Phage Libraries by DNA Shuffling*, *Nature Medicine* 2: 100-103; Crameri et al (1996), *Improved Green Fluorescent Protein by Molecular Evolution Using DNA Shuffling*, *Nature Biotechnology* 14: 315-319; Gates et al (1996), *Affinity Selective Isolation of Ligands from Peptide Libraries through Display on a lac Repressor "Headpiece Dimer"*, *Journal of Molecular Biology* 255: 373-386; Stemmer (1996), *Sexual PCR and Assembly PCR*, em *The Encyclopedia of Molecular Biology*, VCH Publishers, Nova Iorque, págs. 447-457; Crameri e Stemmer (1995), *Combinatorial Multiple Cassette Mutagenesis Creates All the Permutations of Mutant and Wildtype Cassettes*, *BioTechniques* 18: 194-195; Stemmer et al (1995), *Single-Step Assembly of a Gene and Entire Plasmid from Large Numbers of Oligodeoxyribonucleotides*, *Gene*, 164: 49-53; Stemmer (1995), *The Evolution of Molecular Computation*, *Science* 270: 1510; Stemmer (1995), *Searching*

Sequence Space, Bio/Technology 13: 549-553; Stemmer (1994), *Rapid Evolution of a Protein in Vitro by DNA Shuffling, Nature* 370: 389-391; e Stemmer (1994), *DNA Shuffling by Random Fragmentation and Reassembly: In Vitro Recombination for Molecular Evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 10747-10751.

[0155] Detalhes adicionais referentes a diversos métodos de geração de diversidade podem ser encontrados, por exemplo, nas patentes norte-americanas, patentes PCT e patentes EPO a seguir: Patentes Norte-Americanas nº 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252 e 5.837.458; WO 95/22625, WO 96/33207, WO 97/20078, WO 97/35966, WO 99/41402, WO 99/41383, WO 99/41369, WO 99/41368, EP 752008, EO 0932670, WO 99/23107, WO 99/21979, WO 98/31837, WO 98/27230, WO 98/13487, WO 00/00632, WO 00/09679, WO 98/42832, WO 99/29902, WO 98/41653, WO 98/41622, WO 98/42727, WO 00/18906, WO 00/04190, WO 00/42561, WO 00/42559, WO 00/42560, WO 01/23401 e WO 01/64864.

[0156] Detalhes adicionais referentes a diversos métodos de geração podem ser encontrados, por exemplo, nos Pedidos de Patente Norte-Americanos com nº de série 09/407.800 e 60/186.482; Patentes Norte-Americanas nº 6.379.964, 6.376.246, 6.436.675, 6.642.426 e 7.024.312; WO 00/42561, WO 00/42560 e WO 00/42559.

[0157] Resumidamente, diversas classes gerais diferentes de métodos de modificação de sequências, tais como mutação, recombinação etc. são descritos nas referências acima. Consequentemente, os ácidos nucleicos de DGAT de acordo com a presente invenção podem ser gerados a partir de sequências do tipo selvagem. Além disso, as sequências de ácido nucleico de DGAT de acordo com a presente invenção podem ser modificadas para criar sequências modificadas com atividade idêntica ou diferente.

[0158] Podem também ser utilizados métodos de recombinação

sintética, nos quais oligonucleotídeos correspondentes a alvos de interesse são sintetizados e novamente montados em reações de ligação ou PCR que incluem oligonucleotídeos que correspondem a mais de um ácido nucleico parental, de forma a gerar novos ácidos nucleicos recombinados. Os oligonucleotídeos podem ser elaborados por meio de métodos de adição de nucleotídeos padrão ou podem ser elaborados, por exemplo, por meio de abordagens sintéticas de trinucleotídeos. Detalhes referentes a essas abordagens são encontrados nas referências indicadas acima, incluindo, por exemplo, WO 00/42561, WO 01/23401, WO 00/42560 e WO 00/42559.

[0159] Podem ser realizados métodos de recombinação *in silico* nos quais são utilizados algoritmos genéticos em um computador para recombinar conjuntos de sequências que correspondem a ácidos nucleicos homólogos (ou mesmo não homólogos). Os conjuntos de sequência recombinados resultantes são opcionalmente convertidos em ácidos nucleicos por meio de síntese de ácidos nucleicos que correspondem às sequências recombinadas, por exemplo, em conjunto com métodos de remontagem de genes e síntese de oligonucleotídeos. Esta abordagem pode gerar variantes aleatórias, parcialmente aleatórias ou projetadas. Muitos detalhes referentes à recombinação *in silico*, incluindo o uso de algoritmos genéticos, operadores genéticos e similares em sistemas computadorizados, em combinação com a geração de ácidos nucleicos (e/ou proteínas) correspondentes, bem como combinações de ácidos nucleicos e/ou proteínas projetadas (com base, por exemplo, em seleção de locais de cruzamento) e ainda métodos de recombinação projetada, pseudoaleatória ou aleatória, são descritos em WO 00/42560 e WO 00/42559. Extensos detalhes sobre métodos de recombinação *in silico* são encontrados nesses pedidos. Esta metodologia é geralmente aplicável à presente invenção para fornecimento de recombinação de sequências de ácidos nucleicos e/ou construções de fusão genética que

codificam proteínas DGAT *in silico* e/ou geração de proteínas ou ácidos nucleicos correspondentes.

[0160] Muitas das metodologias de geração de polinucleotídeos modificados descritas acima geram uma grande quantidade de variantes diversas de uma ou mais sequências parentais. Em algumas realizações preferidas da presente invenção, o método de modificação (tal como alguma forma de alteração) é utilizado para gerar uma biblioteca de variantes que é selecionada em seguida por um polinucleotídeo modificado ou conjunto de polinucleotídeos modificados que codificam algum atributo funcional desejado, tal como maior atividade de DGAT. Exemplos de atividades enzimáticas que podem ser selecionadas incluem velocidades catalíticas (convencionalmente caracterizadas em termos de constantes cinéticas tais como k_{cat} e K_M), especificidade de substratos e susceptibilidade à desativação ou inibição por substrato, produto ou outras moléculas (tais como inibidores ou ativadores).

[0161] Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um fragmento de ácido nucleico isolado e métodos de uso do mencionado fragmento, que codifica um polipeptídeo diacilglicerol transferase do tipo 1 modificado de tal forma que o polipeptídeo diacilglicerol transferase do tipo 1 modificado contenha pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada a partir do grupo que consiste em: uma não alanina em uma posição correspondente à posição 12 de SEQ ID N° 12 em alanina, uma não prolina em uma posição correspondente à posição 30 de SEQ ID N° 12 em prolina, uma não alanina em uma posição correspondente à posição 31 de SEQ ID N° 12 em alanina, uma não serina em uma posição correspondente à posição 48 de SEQ ID N° 12 em serina, uma não serina em uma posição correspondente à posição 49 de SEQ ID N° 12 em serina, um não aspartato em uma posição correspondente à posição 51 de SEQ ID N° 12 em aspartato, um não aspartato em uma posição correspondente à posição 52 de SEQ ID N° 12 em aspartato,

uma não treonina em uma posição correspondente à posição 59 de SEQ ID N° 12 em treonina, uma não asparagina em uma posição correspondente à posição 79 de SEQ ID N° 12 em asparagina, uma não leucina em uma posição correspondente à posição 118 de SEQ ID N° 12 em leucina, uma não alanina em uma posição correspondente à posição 123 de SEQ ID N° 12 em alanina, uma não valina em uma posição correspondente à posição 128 de SEQ ID N° 12 em valina, uma não leucina em uma posição correspondente à posição 139 de SEQ ID N° 12 em leucina, uma não isoleucina em uma posição correspondente à posição 155 de SEQ ID N° 12 em isoleucina, uma não alanina em uma posição correspondente à posição 181 de SEQ ID N° 12 em alanina, uma não serina em uma posição correspondente à posição 184 de SEQ ID N° 12 em serina, uma não valina em uma posição correspondente à posição 197 de SEQ ID N° 12 em valina, uma não valina em uma posição correspondente à posição 198 de SEQ ID N° 12 em valina, uma não metionina em uma posição correspondente à posição 205 de SEQ ID N° 12 em metionina, uma não treonina em uma posição correspondente à posição 211 de SEQ ID N° 12 em treonina, uma não histidina em uma posição correspondente à posição 218 de SEQ ID N° 12 em histidina, uma não valina em uma posição correspondente à posição 222 de SEQ ID N° 12 em valina, uma não lisina em uma posição correspondente à posição 241 de SEQ ID N° 12 em lisina, uma não valina em uma posição correspondente à posição 247 de SEQ ID N° 12 em valina, uma não valina em uma posição correspondente à posição 251 de SEQ ID N° 12 em valina, uma não serina em uma posição correspondente à posição 256 de SEQ ID N° 12 em serina, uma não serina em uma posição correspondente à posição 257 de SEQ ID N° 12 em serina, uma não fenilalanina em uma posição correspondente à posição 266 de SEQ ID N° 12 em fenilalanina, uma não alanina em uma posição correspondente à posição 267 de SEQ ID N° 12 em alanina, um não glutamato em uma posição

correspondente à posição 281 de SEQ ID N° 12 em glutamato, um não aspartato em uma posição correspondente à posição 288 de SEQ ID N° 12 em aspartato, um não glutamato em uma posição correspondente à posição 293 de SEQ ID N° 12 em glutamato, uma não asparagina em uma posição correspondente à posição 294 de SEQ ID N° 12 em asparagina, uma não treonina em uma posição correspondente à posição 299 de SEQ ID N° 12 em treonina, uma não asparagina em uma posição correspondente à posição 301 de SEQ ID N° 12 em asparagina, uma não leucina em uma posição correspondente à posição 308 de SEQ ID N° 12 em leucina, uma não glicina em uma posição correspondente à posição 327 de SEQ ID N° 12 em glicina, uma não leucina em uma posição correspondente à posição 329 de SEQ ID N° 12 em leucina, uma não leucina em uma posição correspondente à posição 334 de SEQ ID N° 12 em leucina, uma não valina em uma posição correspondente à posição 337 de SEQ ID N° 12 em valina, uma não valina em uma posição correspondente à posição 338 de SEQ ID N° 12 em valina, uma não glutamina em uma posição correspondente à posição 356 de SEQ ID N° 12 em glutamina, uma não asparagina em uma posição correspondente à posição 363 de SEQ ID N° 12 em asparagina, uma não serina em uma posição correspondente à posição 390 de SEQ ID N° 12 em serina, uma não valina em uma posição correspondente à posição 399 de SEQ ID N° 12 em valina, uma não isoleucina em uma posição correspondente à posição 436 de SEQ ID N° 12 em isoleucina, uma não alanina em uma posição correspondente à posição 451 de SEQ ID N° 12 em alanina, uma não serina em uma posição correspondente à posição 457 de SEQ ID N° 12 em serina, uma não metionina em uma posição correspondente à posição 475 de SEQ ID N° 12 em metionina, uma não fenilalanina em uma posição correspondente à posição 486 de SEQ ID N° 12 em fenilalanina, uma não isoleucina em uma posição correspondente à posição 488 de SEQ ID N° 12 em isoleucina, uma não leucina em uma

posição correspondente à posição 491 de SEQ ID N° 12 em leucina, uma não lisina em uma posição correspondente à posição 502 de SEQ ID N° 12 em lisina, uma não serina em uma posição correspondente à posição 514 de SEQ ID N° 12 em serina, uma não valina em uma posição correspondente à posição 518 de SEQ ID N° 12 em valina e uma não valina em uma posição correspondente à posição 531 de SEQ ID N° 12 em valina, em comparação com o polipeptídeo diacilglicerol aciltransferase do tipo 1 não modificado, em que a posição correspondente a uma posição de SEQ ID N° 12 é baseada em um alinhamento utilizando Clustal V de SEQ ID N° 12 e o polipeptídeo diacilglicerol aciltransferase do tipo 1 não modificado.

[0162] Além disso, a presente invenção também se refere a um fragmento de ácido nucleico e métodos de uso do mencionado fragmento de ácido nucleico isolado, que codifica um polipeptídeo diacilglicerol aciltransferase do tipo 1 modificado, de tal forma que o polipeptídeo diacilglicerol aciltransferase do tipo 1 modificado possua pelo menos uma substituição de aminoácido selecionada a partir do grupo que consiste em: uma não alanina em uma posição correspondente à posição 24 de SEQ ID N° 153 em alanina, uma não asparagina em uma posição correspondente à posição 58 de SEQ ID N° 153 em asparagina, uma não alanina em uma posição correspondente à posição 146 de SEQ ID N° 153 em alanina, uma não metionina em uma posição correspondente à posição 170 de SEQ ID N° 153 em metionina, uma não lisina em uma posição correspondente à posição 206 de SEQ ID N° 153 em lisina, uma não valina em uma posição correspondente à posição 216 de SEQ ID N° 153 em valina, uma não fenilalanina em uma posição correspondente à posição 231 de SEQ ID N° 153 em fenilalanina, um não glutamato em uma posição correspondente à posição 258 de SEQ ID N° 153 em glutamato, uma não treonina em uma posição correspondente à posição 264 de SEQ ID N° 153 em treonina, uma não leucina em uma posição

correspondente à posição 273 de SEQ ID Nº 153 em leucina, uma não leucina em uma posição correspondente à posição 299 de SEQ ID Nº 153 em leucina, uma não valina em uma posição correspondente à posição 303 de SEQ ID Nº 153 em valina, uma não serina em uma posição correspondente à posição 355 de SEQ ID Nº 153 em serina, uma não valina em uma posição correspondente à posição 364 de SEQ ID Nº 153 em valina, uma não arginina em uma posição correspondente à posição 401 de SEQ ID Nº 153 em arginina, uma não serina em uma posição correspondente à posição 422 de SEQ ID Nº 153 em serina, uma não metionina em uma posição correspondente 440 de SEQ ID Nº 153 em metionina, uma não lisina em uma posição correspondente à posição 467 de SEQ ID Nº 153 em lisina, uma não serina em uma posição correspondente à posição 479 de SEQ ID Nº 153 em serina, uma não valina em uma posição correspondente à posição 483 de SEQ ID Nº 153 em valina, em comparação com o polipeptídeo diacilglicerol aciltransferase do tipo 1 não modificado, em que a posição correspondente a uma posição de SEQ ID Nº 153 é baseada em um alinhamento utilizando Clustal V de SEQ ID Nº 153 e o polipeptídeo diacilglicerol aciltransferase do tipo 1 não modificado.

[0163] Apreciar-se-á que a presente invenção inclui plantas e prole que incorporam o ácido nucleico isolado mencionado acima. Outras alterações das posições de aminoácidos que podem contribuir com a criação de um polipeptídeo DGAT que pode resultar em aumento dos níveis de ácido graxo em plantas podem ser encontradas nas sequências de avelã alteradas (SEQ ID Nº 25 a 150), nos DGATs de milho alterados (SEQ ID Nº 163 a 170) e nos DGATs de soja alterados (SEQ ID Nº 152-161 e 184-195). Qualquer uma dessas alterações, todas elas ou qualquer de suas combinações são úteis para a elaboração de um DGAT alterado que, quando expresso em uma planta, resulta em aumento do acúmulo de óleo. Realizações preferidas da presente invenção incluiriam, mas sem limitações, pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 alterações de aminoácidos em um polipeptídeo DGAT, nas posições mencionadas acima.

[0164] Em um aspecto final, a presente invenção refere-se a uma célula fúngica ou organismo microbiano oleaginoso, que compreende uma construção de DNA recombinante que compreende qualquer fragmento de ácido nucleico isolado que codifica qualquer diacilglicerol aciltransferase de acordo com a presente invenção. Além disso, a célula fúngica pode ser, mas sem limitações, *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Lipomyces*.

EXEMPLOS

[0165] A presente invenção é adicionalmente definida nos Exemplos a seguir, nos quais as partes e percentuais são em peso e os graus são Celsius, a menos que indicado em contrário. Dever-se-á observar que estes Exemplos, embora indiquem realizações preferidas da presente invenção, são fornecidos unicamente como forma de ilustração. A partir da discussão acima e destes Exemplos, os técnicos no assunto podem determinar as características essenciais da presente invenção e, sem abandonar o seu espírito e escopo, podem realizar diversas alterações e modificações da presente invenção para adaptá-la a vários usos e condições. Desta forma, diversas modificações da presente invenção além das exibidas e descritas no presente serão evidentes para os técnicos no assunto a partir da descrição acima. Essas modificações também se destinam a enquadrar-se no escopo das reivindicações anexas.

[0166] O significado de abreviações é o seguinte: “seg” indica segundo(s), “min” indica minuto(s), “h” indica hora(s), “d” indica dia(s), “μl” indica microlitro(s), “ml” indica mililitro(s), “l” indica litro(s), “μM” indica micromolar, “mM” indica milimolar, “M” indica molar, “mmol” indica milimol(es), “μmol” indica micromol(es), “g” indica grama(s), “μg” indica micrograma(s), “ng”

indica nanograma(s), “U” indica unidade(s), “bp” indica par(es) de bases e “kB” indica quilobase(s).

EXEMPLO 1

CLONAGEM DE cDNAs DE DGAT DO TIPO I DE NOZ PECÃ E AVELÃ

[0167] Foram colhidas nozes em desenvolvimento de noz pecã (*Carya ovata*) e avelã (*Corylus americana*). As cascas foram quebradas e a parte comestível foi removida e rapidamente congelada em nitrogênio líquido, seguido por armazenagem adicional em um congelador a -80 °C até o necessário. O material congelado de uma noz pecã e de avelã foi moído separadamente sob nitrogênio líquido com um pilão e almofariz. RNA total foi isolado de cada uma utilizando um kit RNA Purescript da Gentra Systems (adquirida pela Qiagen) e, em seguida, póli A RNA foi isolado de noz pecã utilizando um kit de mRNA da GE Biosciences. Utilizando póli A RNA como modelo para noz pecã e RNA total como modelo para avelã, a síntese de cDNA de primeira linhagem foi realizada com um kit SuperScript III adquirido da Invitrogen utilizando oligo d(T) como primer e seguindo o protocolo do fabricante.

[0168] Para obter cDNAs de DGAT de avelã e noz pecã com comprimento parcial, realizou-se PCR com cDNA de primeira fita como modelo, utilizando os primers P21 e P18 de regiões conservadas de genes DGAT do tipo I conhecidos. A sequência de nucleotídeos do primer frontal P21 foi 5'-CAAGGAGAGTCCGCTTAGCTC-3'. A sequência de nucleotídeos do primer reverso P18 foi 5'-CAGAAAATGAACCAGAAGATCATGTT-3'. O PCR foi realizado utilizando três ciclos de 94 °C por trinta segundos/43 °C por trinta segundos/72 °C por dois minutos, seguidos por 35 ciclos de 94 °C por trinta segundos/55 °C por trinta segundos/72 °C por dois minutos, seguidos por uma extensão final de 72 °C por dez minutos. Os produtos de PCR foram sequenciados para verificar que apresentavam homologia de sequência com

cDNAs de DGAT conhecidos.

[0169] O restante das regiões de codificação de DGAT foi obtido com os sistemas 5' RACE e 3' RACE da Invitrogen, utilizando primers específicos de genes de acordo com os protocolos do fabricante. Foi realizado PCR final em seguida para amplificar toda a região de codificação e incluir locais de restrição para facilitar a clonagem. O PCR foi realizado utilizando três ciclos de 94 °C por trinta segundos/43 °C por trinta segundos/72 °C por dois minutos, seguido por 35 ciclos de 94 °C por trinta segundos/55 °C por trinta segundos/72 °C por dois minutos, seguido por uma extensão final de 72 °C por dez minutos. Sequências de nucleotídeos de primers de PCR utilizados para noz pecã foram: primer frontal P33, 5'-TTTTGGATCCATGGCGATTTTCGGATATGCCTG-3', e primer reverso P34, 5'-TTTTCCCGGGTTATTCAGTCTGCCCTTTTCGGTTC-3'. As sequências de nucleotídeos para primers de PCR utilizados para avelã foram: primer frontal P37b, 5'-TTTTAGATCTATGGCGATTTTCGGATATGCCTGAAAGCACG-3' e primer reverso p38, 5'-TTTTCCCGGGTTATTCAGTCTTCCCTTTACGGTTCATC-3'. Os produtos de PCR resultante que contêm a região de codificação completa foram digeridos por BamHI e SmaI para noz pecã ou BglII e SmaI para avelã e ligados aos locais BamHI e SmaI do vetor de expressão de leveduras pSZ378 (SEQ ID N° 22 e Figura 1). O vetor pSZ378 foi elaborado por meio da aquisição de pRS426 da Stratagene e adição de regiões de cerca de 1,0 kb de promotor e 0,5 kb de terminal do gene PGK1 de *S. cerevisiae* que codifica 3-fosfoglicerato quinase. Este vetor pode também ser utilizado para transformar *E. coli* para preparações de DNA de plasmídeo de rotina, mas não para expressão de DGAT.

[0170] Dois cDNAs de DGAT de noz pecã próximos e um cDNA de DGAT de avelã foram obtidos e denominados CO-DGAT1a, CO-DGAT1b e CA-DGAT1, respectivamente. As sequências de nucleotídeos correspondentes

são SEQ ID Nº 7, 9 e 11, respectivamente. As sequências de aminoácidos correspondentes são SEQ ID Nº 8, 10 e 12, respectivamente. Os nomes de plasmídeos correspondentes para os genes DGAT (os termos “gene” e “cDNA” são utilizados de forma intercambiável nestes Exemplos) após a ligação ao vetor de expressão de leveduras são PHP32238 (SEQ ID Nº 13), PHP 32396 (SEQ ID Nº 14) e PHP32395 (SEQ ID Nº 15), respectivamente. As identidades de sequência de aminoácidos foram analisadas para determinar os DGATs de nozes comestíveis e para outros DGATs do tipo I de soja (SEQ ID Nº 16, Patente PCT nº WO 00/32756), *Arabidopsis* (SEQ ID Nº 17, acesso nº CAB45373), trigo (SEQ ID Nº 18, Patente PCT nº WO 00/32756) e milho (SEQ ID Nº 19, acesso nº EU039830, apresentado em *Nature Genetics* 40: 367-372) utilizando o programa de alinhamento de sequências Clustal V (Tabela 2). As duas sequências de DGAT de noz pecã diferem em apenas três aminoácidos.

TABELA 2

IDENTIDADES DE SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DGAT (%)

	Nogueira (CO- DGAT1a)	Nogueira (CO- DGAT1b)	Avelã (CA- DGAT1)	Soja	Arab.	Trigo	Milho
Nogueira (CO- DGAT1a)	100	99	83	73	66	65	66
Nogueira (CO- DGAT1b)		100	83	73	66	64	66
Avelã (CA- DGAT1)			100	76	67	64	64
Soja				100	66	61	63
Arab.					100	59	61
Trigo						100	74
Milho							100

EXEMPLO 2

EXPRESSÃO DE cDNAs DE DGAT DE NOZ PECÃ E AVELÃ EM LEVEDURA E

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE DGAT

[0171] Uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* nula dupla

com exclusões do gene DGA1 que codifica DGAT e o gene LRO1 que codifica fosfolípido:diacilglicerol aciltransferase (PDAT) foi criada como uma linhagem com deficiência de óleo apropriada para expressão ectópica de cDNAs de DGAT de avelã e noz pecã. A linhagem nula dupla foi elaborada por meio de aquisição da linhagem com deficiência no gene DGA1 (DGAT) da Invitrogen (ID do clone: 12501) e remoção em seguida do gene LRO1 (PDAT) utilizando recombinação homóloga.

[0172] Preparações de membranas microssomais de cultivos de levedura transformados com os vetores de expressão de DGAT de avelã e noz pecã PHP32238, PHP32396 e PHP32395 e com o vetor de controle DGAT pSZ378 foram utilizadas para testes da atividade de DGAT. Para preparações de membranas microssomais, foi seguido o método de Milcamps *et al*, *J. Biol. Chem.* 280: 5370-5377, com pequenas alterações. Cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* foram cultivados até fase estacionária inicial em 100 ml de meios SC menos uracil (20 g de glicose, 6,7 g de base N de levedura Difco sem aminoácidos e 0,77 g de suplemento Ura DO por litro). Após a colheita, as pelotas de levedura foram novamente suspensas em 4 ml de 20 mM de Tris-HCl, pH 8, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA, 5% de glicerol, 1 mM de DTT e 0,3 M de (NH₄)₂SO₄. Foram adicionados 2 ml de esferas de vidro (425 a 600 µm, catálogo Sigma nº G8772) e as células foram lisadas por meio de turbilhonamento por cinco minutos. O lisado foi centrifugado por quinze minutos a 1500 g e 6 °C. O sobrenadante foi centrifugado em seguida a 100.000 g por uma hora e meia a 6 °C. A pelota microssomal foi novamente suspensa em 500 µl de 100 mM de fosfato de potássio (pH 7,2) contendo 10% de glicerol e congelada em nitrogênio líquido antes da armazenagem a -80 °C. As concentrações de proteínas foram determinadas por meio do método de Bradford, utilizando o reagente Coomassie Plus (Pierce), com albumina de soro bovino como padrão.

[0173] Foram realizados testes de DGAT por um minuto a 25 °C com 50 mM de fosfato de potássio, pH 7,2, 10 µM de oleoil-coenzima A 1-¹⁴C marcada (Perkin Elmer) e 20 µg de proteína microssomal, utilizando diacilglicerol endógeno, em um volume de reação total de 100 µl. A reação foi iniciada por meio da adição das membranas microssomais ao restante dos componentes de reação. O teste foi suspenso e os lipídios foram extraídos com 2 ml de hexano: isopropanol (3:2) (Hara e Radin, *Anal. Biochem.* 90: 420-426) contendo 4 µl de triacilglicerol não marcado (trioleína, catálogo Sigma nº T7140). Após turbilhonamento por dez segundos, as fases foram separadas com 1 ml de 500 mM de sulfato de sódio e o turbilhonamento foi novamente realizado por dez segundos. Após dez minutos, a fase superior foi transferida para um outro tubo e seca com gás nitrogênio. O lipídio foi novamente solubilizado em um pequeno volume de hexano (cerca de 100 a 150 µl) e aplicado a placas TLC de sílica K6, que foram desenvolvidas em 80:20:1 (v/v) hexano: dietiléter: ácido acético. Triacilglicerol foi visualizado e marcado por meio de manchas em vapor de iodo. Após o clareamento das manchas, o triacilglicerol foi raspado e a radioatividade foi determinada por meio de contagem de cintilação líquida.

[0174] Todos os três cDNAs de DGAT foram funcionais (Tabela 3), conforme indicado por atividade muito maior que a observada para o vetor controle.

TABELA 3

ATIVIDADE DE DGAT APÓS A EXPRESSÃO EM LEVEDURA

cDNA de DGAT expresso em DGAT/PDAT nulo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Atividade de DGAT (pmol de oleoil-CoA C14-marcado incorporado em TAG por minuto por mg de proteína microssomal) - média ± desvio padrão de testes duplicados
Avelã (CA-DGAT1)	3622 ± 208
Nogueira (CO-DGAT1a)	3004 ± 190
Nogueira (CO-DGAT1b)	2905 ± 143
Vetor controle (sem DGAT)	16,7 ± 3,9

EXEMPLO 3

EXPRESSÃO DE CA-DGAT1 EM EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA AUMENTA O TEOR DE ÓLEO E O TEOR DE ÁCIDO OLEICO

[0175] Foi construído um vetor de transformação de soja KS 394 (SEQ ID Nº 20) que incluiu o promotor da subunidade α' de β -conglucina de soja (Beachy *et al*, *EMBO J.* 4: 3047-3053) que dirige a expressão do cDNA de DGAT de avelã do tipo selvagem CA-DGAT1. Também foi construído um vetor controle KS 352 (SEQ ID Nº 21) que não continha genes DGAT.

[0176] Cultivos de suspensão embriogênica de soja foram transformados com DNA de plasmídeo intacto de KS 394 ou KS 352 por meio do método de bombardeio de disparador de partículas (Klein *et al*, *Nature* 327: 70 (1987)) utilizando um instrumento DuPont Biolistic PDS1000/HE (retroajuste de hélio). Os métodos de cultivo de tecidos e transformação são descritos abaixo com mais detalhes.

CONDIÇÕES DE CULTIVO

[0177] Cultivos de suspensão embriogênica de soja (cv. Jack) foram mantidos em 35 ml de meio líquido SB196 (abaixo) em um agitador giratório, 150 rpm, 26 °C com lâmpadas fluorescentes brancas frias em um fotoperíodo de 16:8 horas de dia/noite sob intensidade de luz de 60 a 85 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Os cultivos foram subcultivados a cada sete dias até duas semanas por meio de inoculação de cerca de 35 mg de tecido em 35 ml de SB196 líquido novo (o intervalo de subcultivo preferido é a cada sete dias).

INÍCIO DO CULTIVO DE SUSPENSÃO EMBRIOGÊNICA DE SOJA

[0178] Os cultivos de soja foram iniciados duas vezes por mês com cinco a sete dias entre cada início. Vagens com sementes imaturas de plantas de soja disponíveis em 45 a 55 dias após o plantio foram colhidas, removidas das suas cascas e colocadas em uma caixa magenta esterilizada. As sementes de soja foram esterilizadas por meio da sua agitação por quinze

minutos em uma solução de Clorox a 5% com uma gota de sabão Ivory (ou seja, 95 ml de água destilada em autoclave mais 5 ml de Clorox e uma gota de sabão, bem misturados). As sementes foram enxaguadas utilizando duas garrafas de um litro de água destilada estéril e aquelas com menos de 4 mm foram colocadas sobre lâminas de microscópio individuais. A extremidade pequena da semente foi cortada e os cotilédones foram prensados para fora do revestimento da semente. Os cotilédones foram transferidos para placas contendo meio SB199 (25 a 30 cotilédones por placa) por duas semanas e transferidos em seguida para SB1 por duas a quatro semanas. As placas foram embaladas com fita de fibra. Após esse período, embriões secundários foram cortados e colocados em meio líquido SB196 por sete dias.

PREPARAÇÃO DE DNA PARA BOMBARDEIO

[0179] Uma parcela de 50 µl de água destilada estéril contendo 1 mg de partículas de ouro foi adicionada a 5 µl de uma solução de 1 µg/µl de DNA, 50 µl de 2,5 M de CaCl₂ e 20 µl de 0,1 M de espermidina. A mistura foi pulsada por cinco vezes sobre nível 4 de um agitador por turbilhonamento e centrifugada por cinco segundos em um microcentrifugador de bancada. Após lavagem com 150 µl de etanol a 100%, a pelota foi suspensa por meio de sonicação em 85 µl de etanol a 100%. Cinco microlitros de suspensão de DNA foram liberados para cada disco suspenso do disco de instrumento Biolistic PDS1000/HE. Cada parcela de 5 µl continha cerca de 0,058 mg de partículas de ouro por bombardeio (ou seja, por disco).

PREPARAÇÃO DE TECIDO E BOMBARDEIO COM DNA

[0180] Cerca de 100 a 150 mg de cultivos de suspensão embrionária com sete dias de idade foram colocados em uma placa de Petri de 60 x 15 mm estéril vazia no interior de uma placa de Petri de 150 x 25 mm vazia. O tecido foi bombardeado por uma vez por placa com pressão de rompimento de membrana definida a 650 psi e a câmara foi evacuada até um

vácuo de 685 a 711 milímetros de mercúrio. O tecido foi colocado a cerca de 6,3 cm da tela de retenção/parada.

SELEÇÃO DE EMBRIÕES TRANSFORMADOS

[0181] Os embriões transformados foram selecionados utilizando higromicina como marcador selecionável. Especificamente, após o bombardeio, o tecido foi colocado em meio SB196 novo e cultivado conforme descrito acima. Seis a oito dias após o bombardeio, o SB196 é substituído por SB196 novo contendo 30 mg/l de higromicina. O meio de seleção foi renovado semanalmente. Quatro a seis semanas após a seleção, observou-se o crescimento de tecido transformado a partir de conjuntos embriogênicos necróticos não transformados. Tecido verde isolado foi removido e inoculado em placas com múltiplas cavidades para gerar novos cultivos de suspensão embriogênica transformados e propagados de forma clona.

AMADURECIMENTO DOS EMBRIÕES

[0182] Conjuntos embriogênicos transformados foram cultivados por uma a três semanas a 26 °C em SB196 sob lâmpadas fluorescentes brancas frias (Philips Econowatt branca fria F40/CW/RS/EW) e Agro (Philips F40 Agro) em um fotoperíodo de 16:8 horas com intensidade de luz de 90 a 120 E/m²s. Após esse período, os conjuntos de embriões foram removidos para um meio Agar sólido, SB166, por uma semana e subcultivados em seguida em meio SB103 por três semanas.

[0183] Alternativamente, conjuntos de embriões foram removidos para meios líquidos SB228 (SHaM), 35 ml em frasco Erlenmeyer de 250 ml, por duas a três semanas.

[0184] Tecido cultivado em SB228 foi mantido em um agitador giratório, 130 rpm, 26 °C com luzes fluorescentes brancas frias em um fotoperíodo de 16:8 horas de dia/noite com intensidade de luz de 60 a 85 µE/m²/s. Durante esse período, embriões individuais foram removidos dos

conjuntos e selecionados para determinar alterações nas suas composições de ácidos graxos.

RECEITAS DE MEIOS

SB 196 – MEIO DE PROLIFERAÇÃO LÍQUIDO FN LITE (POR LITRO)

MS FeEDTA – 100x solução estoque 1	10 ml
Sulfato de MS – 100x solução estoque 2	10 ml
Haletos de FN Lite – 100x solução estoque 3	10 ml
FN Lite P, B, Mo – 100x solução estoque 4	10 ml
Vitaminas B5 (1 ml/l)	1,0 ml
2,4-D (concentração final de 10 mg/l)	1,0 ml
KNO ₃	2,83 mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,463 mg
Asparagina	1,0 mg
Sacarose (1%)	10 mg
pH 5,8	

SOLUÇÕES ESTOQUE DE FN LITE

Estoque nº	1000 ml	500 ml
1 MS Fe EDTA 100x Padrão		
Na ₂ EDTA*	3,724 g	1,862 g
FeSO ₄ – 7H ₂ O	2,784 g	1,392 g

* Adicionar primeiro e dissolver em garrafa escura mediante agitação;

2 Sulfato de MS 100x solução estoque		
MgSO ₄ – 7H ₂ O	37,0 g	18,5 g
MnSO ₄ – H ₂ O	1,69 g	0,845 g
Estoque nº	1000 ml	500 ml
ZnSO ₄ – 7H ₂ O	0,86 g	0,43 g
CuSO ₄ – 5H ₂ O	0,0025 g	0,00125 g

Estoque nº	1000 ml	500 ml
3	Haletos de FN Lite 100x Solução estoque	
	CaCl ₂ – 2H ₂ O	30,0 g 15,0 g
	KI	0,083 g 0,0715 g
	CoCl ₂ – 6H ₂ O	0,0025 g 0,00125 g
4	FN Lite P, B, Mo 100x Solução estoque	
	KH ₂ PO ₄	18,5 g 9,25 g
	H ₃ BO ₃	0,62 g 0,31 g
	Na ₂ MoO ₄ – 2H ₂ O	0,025 g 0,0125 g.

[0185] Meio Sólido SB1 (por litro):

1 pacote de sais de MS (Gibco/BRL – Cat. nº 11117-066)

1 ml de vitaminas B5 1000x solução estoque

31,5 g de glicose

2 ml de 2,4-D (concentração final de 20 mg/l)

pH 5,7

8 g de TC Agar

[0186] Meio Sólido SB199 (por litro):

1 pacote de sais de MS (Gibco/BRL – Cat. nº 11117-066)

1 ml de vitaminas B5 1000x solução estoque

30 g de sacarose

4 ml de 2,4-D (concentração final de 40 mg/l)

pH 7,0

2 g de Gelrite

[0187] Meio Sólido SB 166 (por litro):

1 pacote de sais de MS (Gibco/BRL – Cat. nº 11117-066)

1 ml de vitaminas B5 1000x solução estoque

60 g de maltose

750 mg de hexa-hidrato de MgCl₂

5 g de carvão ativado

pH 5,7

2 g de Gelrite

[0188] Meio Sólido SB 103 (por litro):

1 pacote de sais de MS (Gibco/BRL – Cat. nº 11117-066)

1 ml de vitaminas B5 1000x solução estoque

60 g de maltose

750 mg de hexa-hidrato de $MgCl_2$

pH 5,7

2 g de Gelrite

MEIO SÓLIDO SB 71-4 (POR LITRO)

[0189] 1 garrafa de sais B5 de Gamborg com sacarose (Gibco/BRL – Cat. nº 21153-036):

pH 5,7

5 g de TC Agar

SOLUÇÃO ESTOQUE DE 2,4-D

[0190] Obter pré-fabricado da Phytotech Cat. nº D 295 – concentração de 1 mg/ml.

SOLUÇÃO ESTOQUE DE VITAMINAS B5 (POR 100 ML)

[0191] Armazenar parcelas a -20 °C:

- 10 g de mioinositol
- 100 mg de ácido nicotínico
- 100 mg de piridoxina HCl
- 1 g de tiamina;

caso a solução não se dissolva com a rapidez necessária, aplicar baixo nível de calor por meio da placa de agitação quente.

SB 228 – HISTODIFERENCIAÇÃO E MATURAÇÃO DE SOJA (SHAM) (POR LITRO)

H₂O DDI

600 ml

Sais de FN-Lite Macro para SHaM 10X	100 ml
Micro sais MS 1000x	1 ml
MS FeEDTA 100x	10 ml
CaCl 100x	6,82 ml
Vitaminas B5 1000x	1 ml
L-metionina	0,149 g
Sacarose	30 g
Sorbitol	30 g
Ajustar volume em	900 ml
pH 5,8	

Autoclave

Adicionar a meios resfriados ($\leq 30\text{ }^{\circ}\text{C}$):

* Glutamina (conc. final 30 mM) 4% 110 ml

* Obs.: o volume final será de 1010 ml após a adição de glutamina.

[0192] Como a glutamina degrada-se de forma relativamente rápida, pode ser preferível adicioná-la imediatamente antes do uso de meios. O vencimento é de duas semanas após a adição de glutamina; meios base podem ser mantidos por mais tempo sem glutamina.

FN-LITE MACRO PARA SHAM 10X – SOLUÇÃO ESTOQUE Nº 1 (POR LITRO)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfato de amônio)	4,63 g
KNO_3 (nitrato de potássio)	28,3 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (hepta-hidrato sulfato de magnésio)	3,7 g
KH_2PO_4 (fosfato de potássio, monobásico)	1,85 g
Trazer para volume	

Autoclave

MS MICRO 1000X – SOLUÇÃO ESTOQUE Nº 2 (POR LITRO)

H_3BO_3 (ácido bórico)	6,2 g
--	-------

MnSO ₄ *H ₂ O (mono-hidrato sulfato de manganês)	16,9 g
ZnSO ₄ *7H ₂ O (hepta-hidrato sulfato de zinco)	8,6 g
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O (di-hidrato molibdato de sódio)	0,25 g
CuSO ₄ *5H ₂ O (penta-hidrato sulfato de cobre)	0,025 g
CoCl ₂ *6H ₂ O (hexa-hidrato cloreto de cobalto)	0,025 g
KI (iodeto de potássio)	0,8300 g

Trazer para volume

Autoclave

FeEDTA 100X – SOLUÇÃO ESTOQUE Nº 3 (POR LITRO)

Na ₂ EDTA* (EDTA de sódio)	3,73 g
FeSO ₄ *7H ₂ O (hepta-hidrato sulfato de ferro)	2,78 g

* EDTA deve ser completamente dissolvido antes da adição de ferro.

Trazer para volume

a solução é fotossensível. A(s) garrafa(s) deverá(ão) ser embalada(s) em folha metálica para proteção contra a luz

Autoclave

CA 100X – SOLUÇÃO ESTOQUE Nº 4 (POR LITRO)

CaCl ₂ *2H ₂ O (di-hidrato cloreto de cálcio)	44 g
---	------

Trazer para volume

Autoclave

VITAMINA B5 1000X – SOLUÇÃO ESTOQUE Nº 5 (POR LITRO)

Tiamina*HCl	10 g
Ácido nicotínico	1 g
Piridoxina*HCl	1 g
Mioinositol	100 g

Trazer para volume

Armazenar congelado

4% GLUTAMINA – SOLUÇÃO ESTOQUE Nº 6 (POR LITRO)

Água DDI aquecida a 30 °C	900 ml
---------------------------	--------

L-glutamina	40 g
-------------	------

Adicionar gradualmente mediante agitação e aplicação de baixo calor

Não exceder 35 °C

Trazer para volume

Esterilizar por filtração

Armazenar congelado *

* Obs.: aquecer solução estoque congelado em banho a 31 °C até dissolver completamente os cristais

ANÁLISE DE ÓLEO

[0193] Embriões somáticos foram colhidos após duas semanas de cultivo no meio de maturação SB228 (SHaM) líquido. Foram criados cerca de sessenta e trinta eventos em transformações com KS 352 e KS 394, respectivamente. Todos os embriões gerados para um dado evento foram colhidos a granel e processados conforme segue. Os embriões foram congelados sobre gelo seco ou por meio de incubação em um congelador a -80 °C por duas horas, seguida por liofilização por 48 horas.

[0194] Embriões secos foram moídos em um pó fino utilizando uma ampola genomoedora (1/2"x2" policarbonato) e uma bola de aço (SPEX Centriprep (Metuchen NJ, Estados Unidos). O tempo de moagem foi de trinta segundos a 1450 oscilações por minuto. Para cada evento, três cópias de cerca de 10 mg de tecido foram pesadas em tubos Eppendorf. O tecido foi extraído utilizando 200 µl de heptano à temperatura ambiente sob agitação contínua por duas horas. Extratos de heptano foram limpos por meio de centrifugação e 25 l de extrato foram derivados em metil ésteres de ácido graxo conforme segue. Adicionou-se 1 ml de uma solução estoque de metóxido de

sódio a 25% a 24 ml de metanol grau de HPLC. Metóxido de sódio foi armazenado sob gás inerte.

[0195] Cinco microlitros de uma solução estoque de 17:0 TAG (Nu-Chek Prep, Elysian MN, Estados Unidos) (10 mg/ml) foram combinados com 25 µl de extrato de tecido de heptano em um tubo de cultivo de vidro e foram adicionados 500 µl de metóxido de sódio a 1%. Amostras foram derivadas em um banho de água a 50 °C por quinze minutos. Amostras foram mantidas em resfriamento à temperatura ambiente e adicionou-se 1 ml de 1 M NaCl, seguido por mistura rápida. FAMES foram extraídos em 1 ml de heptano e 4 µl de amostra foram quantificados por meio de análise GC.

[0196] Os resultados da análise de óleo são apresentados nas Tabelas 4 e 5. O teor médio de metil éster de ácido graxo e o teor de ácido oleico dos embriões transformados com vetor controle KS 352 foram de 4,5% e 17,2%, respectivamente. Os valores correspondentes para embriões transformados com o vetor KS 394 de CA-DGAT1 foram de 7,8% e 25,5%, respectivamente. Estes resultados demonstram que a expressão do cDNA de C-DGAT1 de avelã aumenta o teor de óleo e o teor de ácido oleico de embriões somáticos de soja.

TABELA 4

TEOR DE ÁCIDO OLEICO E ÁCIDO GRAXO ESTERIFICADO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA GERADOS COM A CONSTRUÇÃO CONTROLE SEM DGAT KS 352

Evento nº	KS 352 FAME (% DCW)	Ácido oleico (% FAME total)
22	6,2	18,9
16	5,7	15,8
35	5,6	19,5
48	5,6	18,5
14	5,5	17,3
43	5,5	18,7
42	5,4	19,3
33	5,3	17,2
68	5,3	18,6
3	5,2	18,5

Evento nº	KS 352 FAME (% DCW)	Ácido oleico (% FAME total)
4	5,2	18,9
11	5,2	19,1
41	5,2	16,9
51	5,2	18,2
7	5,1	17,2
10	5,1	19,9
21	5,1	18,2
27	5,1	18,3
1	5	17,6
46	5	18,4
59	5	17,5
66	5	19,3
5	4,9	15,1
15	4,9	15,7
29	4,9	16,5
2	4,8	17,6
9	4,8	17,4
30	4,8	17
34	4,8	16,9
19	4,7	14,8
47	4,7	17,4
67	4,7	22,9
13	4,6	17,2
28	4,6	15,9
39	4,6	18,6
44	4,6	17,1
65	4,6	19,4
6	4,5	13,9
24	4,5	16,1
31	4,5	15,9
20	4,4	17,1
37	4,4	17,3
69	4,4	19,2
50	4,3	17,2
54	4,3	19,5
55	4,3	16,1
64	4,3	18,7
32	4,1	14,4
61	4,1	16,8
23	4	16,1
26	4	13,6
49	4	16,5
18	3,9	16,4
8	3,8	15,5

Evento nº	KS 352 FAME (% DCW)	Ácido oleico (% FAME total)
53	3,8	20,2
63	3,8	17,2
52	3,7	17,3
17	3,6	14,3
36	3,6	15,7
60	3,4	16,6
12	3,3	15,4
45	3,3	15,2
62	3,3	18,8
40	3,2	13,3
25	3	12,3
38	3	16,2
57	2,5	18
56	2,3	18,2
58	2,2	16,5
Média	4,5	17,2

TABELA 5**TEOR DE ÁCIDO OLEICO E ÁCIDO GRAXO ESTERIFICADO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS****DE SOJA GERADOS COM A CONSTRUÇÃO DE CA-DGAT1 KS 394**

Evento nº	KS 394 FAME (% DCW)	Ácido oleico (% FAME total)
2203.2.07	11,9	28,1
2203.1.02	10,3	29,2
2203.1.03	10,1	26,1
2203.2.17	9,1	28,2
2203.1.01	9,2	26,7
2203.2.13	8,8	29,0
2203.2.08	8,1	28,6
2203.2.09	8,3	27,5
2203.1.05	8,2	23,1
2203.2.01	9,1	20,4
2203.2.14	7,4	24,7
2203.2.12	8,0	26,4
2203.2.04	7,9	28,9
2203.2.02	8,3	29,3
2203.2.15	7,7	20,9
2203.4.03	7,4	24,3
2203.1.04	7,6	23,6
2203.1.06	7,8	25,3
2203.2.05	8,4	30,0
2203.2.03	8,0	27,9
2203.2.06	7,7	24,2
2203.2.16	7,5	26,3

Evento nº	KS 394 FAME (% DCW)	Ácido oleico (% FAME total)
2203.2.10	7,3	24,4
2203.4.07	6,9	26,4
2203.4.01	6,8	25,7
2203.1.07	6,6	25,2
2203.1.08	7,0	24,1
2203.2.11	6,6	23,2
2203.4.06	6,0	26,7
2203.4.05	6,2	18,9
2203.4.10	5,0	23,0
2203.5.01	5,1	20,9
Média	7,8	25,5

EXEMPLO 4

CRIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE GENES DGAT INOVADORES QUE FORNECEM ALTO TEOR DE ÓLEO EM LEVEDURA

[0197] Foram geradas bibliotecas de polinucleotídeos de DGAT modificados utilizando métodos de recombinação de sequências recursivas (Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 10747-10751; Ness *et al*, *Nature Biotechnology* 20: 1251-1255). Essas bibliotecas incorporaram diversidade de enzimas relacionadas e também incorporaram alterações aleatórias. A sequência de polinucleotídeos inicial na qual foi incorporada a diversidade foi CA-DGAT1* (SEQ ID Nº 23), que codifica a sequência de aminoácidos idêntica a CA-DGAT1 e possui uma sequência de nucleotídeos quase idêntica a CA-DGAT1, exceto pela remoção de locais de restrição de BamH I e EcoR I internos para facilitar a clonagem. Os genes CA-DGAT1* e DGAT inovadores foram clonados nos locais de restrição de BamH I e EcoR I exclusivos do vetor de expressão de levedura pSZ378 descrito no Exemplo 1. O gene CA-DGAT1* no vetor de expressão de levedura é apresentado como SEQ ID Nº 24. O plasmídeo PHP35885 (SEQ ID Nº 151, Figura 2) é um exemplo representativo de um gene DGAT inovador, CA-DGAT1-C11, clonado no vetor de expressão de levedura. As bibliotecas de genes DGAT inovadores foram amplificadas em *E. coli* e transformadas em seguida na linhagem nula dupla de DGAT e PDAT

de *Saccharomyces cerevisiae* descrita no Exemplo 2 utilizando o método de transformação de Giest e Schiestl (*Nature Protocols* 2: 38-41), exceto pelo fato de que o choque de calor foi realizado a 37 °C em vez de 42 °C. Linhagens com alto teor de óleo foram identificadas por meio de manchas com a mancha fluorescente Vermelho do Nilo (Greenspan *et al*, *J. Cell Biol.* 100: 965-973). Pode-se utilizar uma ampla variedade de condições de manchas Vermelho do Nilo com sucesso. Normalmente manchamos, por exemplo, por cinco minutos um volume de 200 µl de uma diluição 1:10 de um cultivo de levedura de dois dias em meio SC menos uracil. A levedura foi manchada com 5 µl de um padrão Vermelho do Nilo a 0,02 mg/ml dissolvido em etanol a 95%. Lemos em seguida a intensidade da fluorescência utilizando um comprimento de onda de excitação de 489 nm e comprimento de emissão de 581 nm. A intensidade da fluorescência foi dissolvida por meio de absorção a 600 nm para corrigir diferenças na densidade celular. Exemplos de outras condições utilizadas com sucesso são cultivos por três dias em vez de dois dias, diluição 1:20 de levedura em vez de 1:10, manchas por dez minutos em vez de cinco minutos, que possuem o padrão Vermelho do Nilo dissolvido em acetona ou DMSO a 25% em vez de etanol e numerosos comprimentos de onda de emissão e excitação diferentes.

[0198] Foram inicialmente geradas e selecionadas seis bibliotecas (bibliotecas A até F). Uma biblioteca J de segunda rodada foi gerada em seguida, combinando a diversidade de alguns dos DGATs inovadores mais promissores obtidos durante a seleção inicial. A biblioteca de segunda rodada foi também amplificada em *E. coli*, transformada na linhagem nula dupla de *Saccharomyces cerevisiae* e selecionada por Vermelho do Nilo conforme descrito para as bibliotecas da primeira rodada. Rodadas adicionais de geração de bibliotecas podem também incluir informações obtidas durante as primeira e segunda rodadas de seleção, bem como diversidade adicional de

enzimas relacionadas. As bibliotecas adicionais podem ser elaboradas por meio de continuação com o CA-DGAT1* elaborado como cadeia principal ou, alternativamente, a diversidade pode ser gerada em um gene DGAT tipo I de milho, soja ou outra fonte.

[0199] O teor de óleo (total de metil ésteres de ácidos graxos na forma de percentual em peso seco) e a composição de ácidos graxos foram determinados por meio de cromatografia de gás quantitativa para linhagens de levedura com altas manchas de Vermelho do Nilo. Cerca de 5 a 15 mg de pó de levedura de cultivos de dois dias foram pesados no fundo de um tubo de cultivo de vidro de 13 x 100 mm com tampa de rosca e vedação de Teflon. Foram adicionados cinco microlitros de uma solução estoque de 17:0 TAG (10 mg/ml em tolueno), seguidos pela adição de 500 µl de ácido sulfúrico a 5% em metanol (anidro). As amostras foram incubadas a 95 °C por uma hora e meia. Em seguida, os tubos foram mantidos em resfriamento à temperatura ambiente, após o quê adicionou-se 1 ml de 1 M de cloreto de sódio por meio de mistura. Adicionou-se 1 ml de heptano, o conteúdo foi misturado e as amostras foram rapidamente centrifugadas para mediar a separação de fases. Cerca de 500 µl da fase orgânica foram transferidos para uma ampola de GC. Metil ésteres de ácidos graxos foram analisados por meio de cromatografia de gás. Quatro litros de extrato de heptano foram analisados em um Cromatógrafo de Gás Hewlett-Packard 6890 equipado com uma coluna capilar de sílica fundida Omegawax 320 (Supelco Inc., Catálogo nº 24152). A temperatura do forno foi programada para manter-se a 220 °C por 2,7 minutos, aumentar para 240 °C a 20 °C/minuto e, em seguida, manter-se por 2,3 minutos adicionais. O gás veículo foi fornecido por um gerador de hidrogênio Whatman. Os tempos de retenção foram comparados com os de metil ésteres de padrões disponíveis comercialmente (Nu-Chek Prep, Inc., catálogo nº U-99-A).

[0200] Os resultados da análise de óleo são apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8. Ácido palmítico, palmitoleico, esteárico e oleico são abreviados como 16:0, 16:1, 18:0 e 18:1, respectivamente. Teor de óleo mais alto (total de metil ésteres de ácido graxo na forma de percentual em peso seco) estava presente em muitas linhagens que expressam DGATs inovadores em comparação com linhagens que expressam CA-DGAT1* ou um vetor controle. Por razões desconhecidas, todo o conjunto de dados da biblioteca J, incluindo os controles CA-DGAT1*, foi inferior ao observado para as outras bibliotecas, mas os DGATs inovadores da Biblioteca J ainda geraram teor de óleo mais alto que os controles CA-DGAT1* deste conjunto de dados. Os dados das Tabelas 6, 7 e 8 confirmaram que as manchas de Vermelho do Nilo realmente são eficazes na identificação de linhagens de levedura com alto teor de óleo e que genes DGAT inovadores são mais eficazes que CA-DGAT1* no aumento do teor de óleo em levedura.

TABELA 6

TEOR DE ÓLEO E COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE LEVEDURA QUE EXPRESSA

GENES DGAT INOVADORES DAS BIBLIOTECAS A, B E C

DGAT expresso	FAME (% peso seco)	% 16:0	% 16:1	% 18:0	% 18:1
CA-DGAT1-A2	24,2	22,5	41,8	6,6	29,1
CA-DGAT1-A3	20,8	23,0	41,8	6,9	28,4
CA-DGAT1-C10	20,5	32,9	30,4	12,2	24,6
CA-DGAT1-C8	20,5	31,5	31,0	12,2	25,3
CA-DGAT1-C12	19,8	31,6	31,1	12,2	25,1
CA-DGAT1-C9	19,5	31,8	31,1	12,3	24,8
CA-DGAT1-C11	19,0	31,9	31,0	12,5	24,7
CA-DGAT1-C13	18,5	31,8	31,0	12,6	24,6
CA-DGAT1-C3	17,9	31,8	32,1	10,7	25,5
CA-DGAT1-C15	17,6	33,0	30,9	12,2	23,9
CA-DGAT1-A1	17,6	32,7	31,4	11,6	24,3
CA-DGAT1-C7	17,5	31,8	30,8	12,6	24,8
CA-DGAT1-C17	17,3	30,9	31,0	11,8	26,3
CA-DGAT1-C1	16,5	33,5	30,3	12,9	23,2
CA-DGAT1-A14	16,4	30,2	33,4	11,8	24,7
CA-DGAT1-C18	16,3	30,7	30,9	11,4	26,9

DGAT expresso	FAME (% peso seco)	% 16:0	% 16:1	% 18:0	% 18:1
CA-DGAT1-C16	16,1	31,1	32,0	10,4	26,6
CA-DGAT1-A9	15,7	29,5	32,5	12,3	25,7
CA-DGAT1-B6	15,6	31,7	31,6	13,3	23,3
CA-DGAT1-A16	15,3	30,4	33,0	11,8	24,8
CA-DGAT1-A13	15,2	30,8	32,7	12,6	23,9
CA-DGAT1-A15	15,0	30,2	34,1	10,0	25,7
CA-DGAT1-A5	14,8	29,7	32,8	12,1	25,5
CA-DGAT1-A7	14,8	29,1	32,5	12,4	26,0
CA-DGAT1-A17	14,7	29,9	32,6	11,9	25,6
CA-DGAT1-C5	14,4	30,6	29,9	12,2	27,3
CA-DGAT1-C14	14,3	30,5	32,1	10,2	27,1
CA-DGAT1-A10	14,2	30,9	32,4	11,9	24,7
CA-DGAT1-A6	14,2	29,1	32,5	12,0	26,4
CA-DGAT1-C6	14,1	30,0	26,9	14,4	28,7
CA-DGAT1-A4	14,1	30,9	32,5	12,6	23,9
CA-DGAT1-A21	13,6	30,5	33,7	10,5	25,3
CA-DGAT1-A23	13,6	30,1	34,0	11,0	24,9
CA-DGAT1-A22	13,5	29,8	34,1	10,8	25,3
CA-DGAT1-A20	13,5	29,7	33,2	11,6	25,5
CA-DGAT1-A24	13,5	29,8	32,8	11,9	25,4
CA-DGAT1-A19	13,2	30,6	33,4	11,9	24,1
CA-DGAT1-A12	13,2	29,9	33,0	11,2	25,9
CA-DGAT1-A8	13,1	28,7	31,9	12,3	27,1
CA-DGAT1-C2	13,0	29,3	28,5	13,7	28,4
CA-DGAT1-A18	13,0	30,0	32,5	12,1	25,4
CA-DGAT1* controle, rep2	13,0	30,2	32,2	12,7	24,9
C4	12,9	29,4	28,0	13,2	29,5
B3	12,5	29,5	30,2	12,9	27,4
A11	11,8	30,5	36,9	9,5	23,1
B8	11,7	30,1	32,1	13,0	24,8
B4	11,6	27,7	28,9	13,2	30,3
CA-DGAT1* controle, rep1	11,5	29,4	32,5	12,2	26,0
CA-DGAT1-B2	10,6	27,2	29,3	13,1	30,4
CA-DGAT1-B5	10,4	28,5	31,2	12,6	27,7
CA-DGAT1-B1	10,3	22,3	33,2	12,0	32,5
CA-DGAT1-B9	10,2	26,9	34,4	10,5	28,2
Controle vetor	3,1	18,9	39,9	13,8	27,4

TABELA 7**TEOR DE ÓLEO E COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE LEVEDURA QUE EXPRESSA****GENES DGAT INOVADORES DAS BIBLIOTECAS D, E E F**

DGAT expresso	FAME (% peso seco)	% 16:0	% 16:1	% 18:0	% 18:1
CA-DGAT1-D2	19,3	32,6	31,1	12,2	23,4
CA-DGAT1-E4	18,5	33,1	29,0	13,4	24,5
CA-DGAT1-D16	18,2	32,5	31,4	12,7	23,4
CA-DGAT1-E3	18,0	30,2	28,8	13,5	27,4
CA-DGAT1-D19	17,5	32,6	31,7	12,4	23,2
CA-DGAT1-D15	16,2	32,4	30,7	12,9	24,0
CA-DGAT1-D5	15,8	30,4	27,1	14,9	27,2
CA-DGAT1-E1	15,3	31,7	35,2	11,8	21,4
CA-DGAT1-F8	15,2	31,8	32,3	12,5	23,3
CA-DGAT1-E2	15,1	29,6	32,0	11,7	26,6
CA-DGAT1-D14	15,0	32,2	30,8	12,9	23,9
CA-DGAT1-E5	15,0	31,0	33,3	11,9	23,8
CA-DGAT1-D4	14,9	29,6	34,5	10,9	24,6
CA-DGAT1-F19	14,8	32,6	32,1	12,5	22,8
CA-DGAT1-D20	14,8	31,5	31,1	14,6	22,7
CA-DGAT1-E8	14,8	32,6	30,4	13,3	23,7
CA-DGAT1-D17	14,5	30,5	33,6	11,3	24,5
CA-DGAT1-E6	14,5	30,9	33,1	11,6	24,3
CA-DGAT1-D10	14,3	31,3	33,5	12,1	23,0
CA-DGAT1-D9	14,3	30,6	32,3	11,5	25,5
CA-DGAT1-F5	14,2	32,0	32,8	12,5	22,7
CA-DGAT1-E19	14,2	31,4	32,7	12,4	23,4
CA-DGAT1-E16	14,0	31,8	32,4	12,7	22,9
CA-DGAT1-E15	13,5	32,1	32,5	12,2	23,1
CA-DGAT1-F7	13,4	31,5	32,4	12,2	23,8
CA-DGAT1-F18	13,3	32,1	31,6	11,9	24,4
CA-DGAT1-F9	13,3	31,6	33,1	12,4	22,8
CA-DGAT1-F12	13,3	32,2	32,1	11,7	23,8
CA-DGAT1-E9	13,2	30,8	26,9	14,8	27,4
CA-DGAT1-D18	13,2	30,1	33,8	11,5	24,5
CA-DGAT1-D12	13,1	30,4	33,3	11,1	25,1
CA-DGAT1-D7	13,1	30,6	33,9	11,1	24,2
CA-DGAT1-D6	13,1	29,8	32,8	11,3	25,7
CA-DGAT1-D8	13,1	29,8	34,9	11,3	23,8
CA-DGAT1-E11	13,0	29,9	34,2	12,0	23,8
CA-DGAT1-E10	12,8	35,8	26,6	14,5	23,1
CA-DGAT1-F20	12,8	31,8	32,2	12,0	24,0
CA-DGAT1-F11	12,8	31,5	33,6	12,1	22,7
CA-DGAT1-F4	12,7	31,8	32,5	11,4	24,3

DGAT expresso	FAME (% peso seco)	% 16:0	% 16:1	% 18:0	% 18:1
CA-DGAT1-E13	12,4	32,4	32,1	12,0	23,5
CA-DGAT1-F6	12,2	32,2	31,1	12,6	24,1
CA-DGAT1-F17	12,2	32,0	31,8	12,1	24,2
CA-DGAT1-E18	12,1	31,7	31,9	12,4	24,0
CA-DGAT1-E12	12,0	29,6	28,3	14,4	27,6
CA-DGAT1-F10	11,7	31,7	32,3	11,7	24,2
CA-DGAT1-F13	11,7	31,7	32,4	11,3	24,6
CA-DGAT1-F1	11,4	28,9	35,1	11,2	24,7
CA-DGAT1-F16	11,3	31,7	32,0	11,6	24,6
CA-DGAT1-D11	10,7	27,5	33,0	11,7	27,6
CA-DGAT1-D13	10,6	25,3	33,9	11,7	29,0
CA-DGAT1* controle, rep1	10,6	29,6	34,9	10,6	24,8
CA-DGAT1-F15	10,5	30,9	32,5	11,2	25,4
CA-DGAT1-F14	10,5	31,4	32,1	11,6	24,9
CA-DGAT1-F2	10,4	31,0	32,0	11,8	25,1
CA-DGAT1-E14	10,4	28,8	34,3	11,4	25,5
CA-DGAT1-E17	10,4	34,0	30,7	12,8	22,4
CA-DGAT1-F3	10,2	31,6	31,5	11,8	24,9
CA-DGAT1* controle, rep2	9,7	29,2	35,1	10,7	25,0
CA-DGAT1-D3	9,4	32,1	29,9	12,0	25,3
CA-DGAT1-D1	7,8	28,6	22,9	12,0	30,9

TABELA 8**TEOR DE ÓLEO E COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE LEVEDURA QUE EXPRESSA****GENES DGAT INOVADORES DA BIBLIOTECA J**

DGAT expresso	FAME (% peso seco)	FAME (média de duplicatas)	16:0%	16:1%	18:0%	18:1%
CA-DGAT1-J1 rep1	11,9		31,9	30,1	13,8	24,1
CA-DGAT1-J1 rep2	11,7	11,8	31,8	30,2	13,7	24,3
CA-DGAT1-J12 rep1	14,8		35,1	31,0	14,4	19,4
CA-DGAT1-J12 rep2	13,2	14,0	35,1	31,3	14,2	19,4
CA-DGAT1-J13 rep1	13,2		32,1	30,4	14,3	23,1
CA-DGAT1-J13 rep2	10,6	11,9	32,5	30,3	14,3	22,9
CA-DGAT1-J16 rep1	12,8		33,6	29,4	14,4	22,6
CA-DGAT1-J16 rep2	11,5	12,2	33,5	29,4	14,6	22,5
CA-DGAT1-J21	14,5		33,3	30,2	13,7	22,8

DGAT expresso	FAME (% peso seco)	FAME (média de duplicatas)	16:0%	16:1%	18:0%	18:1%
rep1						
CA-DGAT1-J21 rep2	15,0	14,7	33,6	30,1	13,7	22,6
CA-DGAT1-J24 rep1	10,8		32,1	29,8	14,1	24,0
CA-DGAT1-J24 rep2	12,4	11,6	32,6	29,9	13,9	23,6
CA-DGAT1-J32 rep1	9,0		31,4	30,1	14,4	24,0
CA-DGAT1-J32 rep2	8,1	8,6	31,4	30,4	14,1	24,2
CA-DGAT1-J34 rep1	12,9		33,4	29,6	14,4	22,6
CA-DGAT1-J34 rep2	11,9	12,4	32,6	30,6	13,9	22,9
CA-DGAT1-J37 rep1	10,8		29,3	30,3	13,0	27,4
CA-DGAT1-J37 rep2	10,0	10,4	29,5	30,3	12,8	27,4
CA-DGAT1-J38 rep1	11,6		28,9	33,6	12,4	25,1
CA-DGAT1-J38 rep2	10,3	11,0	28,9	33,2	12,7	25,2
CA-DGAT1* controle, rep1	8,3		29,7	33,0	12,1	25,2
CA-DGAT1* controle, rep2	7,7	8,0	29,8	32,9	12,1	25,3

EXEMPLO 5

PROTEÍNAS DGAT INOVADORAS POSSUEM ATIVIDADE ESPECÍFICA MAIS ALTA QUE CA-DGAT1*

[0201] Preparações de membranas microssomais de leveduras de algumas linhagens de levedura com alto teor de óleo que expressam genes DGAT inovadores foram utilizadas para testes de atividade e Western Blots para determinar a atividade de DGAT por mg de proteína microssomal, abundância de proteína DGAT relativa e atividade de DGAT ajustada para abundância de proteína DGAT. Os testes de atividade foram elaborados conforme descrito no Exemplo 2, exceto pelo uso de 5 µg de proteína microssomal e 3 µM de 18:1 CoA marcado com C14. A concentração de DAG endógeno e 3 µM de 18:1 CoA aparentemente são concentrações saturadas

para esses dois substratos com a enzima CA-DGAT1*. Western Blots foram sondadas com anticorpos policlonais de coelhos preparados contra o peptídeo NGNDGGEEKIANGEDR (peptídeo 1, SEQ ID Nº 176), correspondente aos resíduos de aminoácidos 93 a 107 da sequência de aminoácidos CA-DGAT1. Esta região de peptídeo antigênico foi idêntica em todas as sequências de DGAT inovadoras examinadas até agora (ou seja, não estava presente nessa região nenhuma mutação que pudesse afetar a potência de sinal em um Western Blot). Vinte microlitros de microssomos de levedura foram misturados com inibidores da protease (1 µl de coquetel inibidor da protease Calbiochem conjunto III, catálogo nº 539134, 1 µl de 0,5 M de EDTA e 0,5 µl de uma solução estoque de 100 mM de PMSF em isopropanol) e incubados sobre gelo quinze minutos antes da adição de tampão de amostra 2X SDS, seguido por SDS-PAGE.

[0202] O sistema de transferência seca de manchas Invitrogen I foi utilizado para transferir proteína para membrana de nitrocelulose. A membrana foi rapidamente enxaguada em TBST (20 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 0,2% Tween 20) e bloqueada por vinte minutos à temperatura ambiente em 5% leite em pó desnatado instantâneo/TBST com leve balanço.

[0203] A membrana foi incubada em seguida por uma hora com uma diluição 1:2000 de antissoro primário em 3% leite/TBST, lavada por três vezes por cinco a dez minutos em TBST e incubada em seguida por uma hora com um anticorpo secundário que consiste em uma diluição 1:5000 de conjugado de HRP anti-IgG de coelho de cabra (Bio-Rad, catálogo nº 170-6515) em leite/TBST a 3%.

[0204] Após lavagem em TBST, a membrana foi incubada por cinco minutos com o substrato SuperSignal West Dura ECL (catálogo Pierce nº 34075). Formou-se imagem das manchas utilizando um sistema de formação

de imagens Fujifilm LAS3000. As densidades de pixels para as faixas alvo foram determinadas com software da TotalLab, Nonlinear TL120 v2006e. Para amostras de controle sobre cada mancha, foram utilizadas várias concentrações de proteína microssomal de levedura que expressa CA-DGAT1*. A abundância relativa de proteína DGAT inovadora presente em microssomos foi calculada por meio de comparação com as amostras de microssomos controle CA-DGAT1*.

[0205] Os resultados dos testes de atividade e Western Blots são relatados na Tabela 9. Como é evidente na coluna à direita da Tabela 9, 14 dos 19 DGATs inovadores examinados apresentaram maior atividade que CA-DGAT1* após o ajuste da abundância da proteína DGAT.

[0206] Três DGATs inovadores (CA-DGAT1-C9, CA-DGAT1-C11 e CA-DGAT1-E3) apresentaram atividades ajustadas mais de três vezes maiores que a de CA-DGAT1*. Esses grandes aumentos da atividade específica de DGAT como resultado de mutagênese não foram relatados anteriormente. Um DGAT inovador (CA-DGAT1-J21) apresentou atividade ajustada similar e apenas quatro (CA-DGAT1-C10, CA-DGAT1-D2, CA-DGAT1-D16 e CA-DGAT1-J16) apresentaram atividade ajustada inferior a CA-DGAT1*.

[0207] Na maior parte dos casos, as proteínas DGAT elaboradas foram menos abundantes em microssomos que a proteína CA-DGAT1*. Menos abundância pode dever-se em nível de expressão mais baixo em levedura ou ao fato de que proporcionalmente mais proteína DGAT inovadora encontrava-se na almofada de gordura, e não na pelota microssomal, em comparação com a proteína CA-DGAT1*.

[0208] Algumas das linhagens de leveduras que expressam DGATs inovadores apresentaram almofadas de gordura extremamente grandes e evidentes durante a preparação microssomal, consistentes com os

teores de óleo muito altos relatados nas Tabelas 6, 7 e 8.

TABELA 9

**ATIVIDADE E ABUNDÂNCIA RELATIVA DE DGAT INOVADOR DE LINHAGENS DE
LEVEDURA COM ALTO TEOR DE ÓLEO**

DGAT	Atividade de DGAT (pmol de oleoil-CoA marcado com C14 incorporado a TAG por minuto por mg de proteína microsomal)	Abundância de DGAT em microsomos com relação a CA-DGAT1*	Atividade de DGAT ajustada para abundância de DGAT (pmol de oleoil-CoA marcado com C14 incorporados em TAG por minuto por mg de proteína microsomal)	Atividade de DGAT ajustada para abundância de DGAT (% de CA-DGAT1*)
CA-DGAT1*	3596	1	3596	100
A2	6184	0,92	6722	187
C9	2169	0,18	12050	335
C10	2307	0,83	2780	77
C11	2362	0,2	11810	328
C13	1880	0,29	6483	180
D2	2809	1,25	2247	62
D16	1891	0,95	1991	55
D19	3025	0,6	5042	140
E3	2285	0,2	11425	318
J1	3128	0,73	4285	119
J12	2738	0,63	4346	121
J13	3384	0,64	5288	147
J16	1753	0,55	3187	89
J21	2797	0,76	3680	102
J24	2778	0,54	5144	143
J32	1266	0,25	5064	141
J34	2742	0,58	4728	131
J37	1951	0,32	6097	170
J38	4142	0,79	5243	146

EXEMPLO 6

**GENES DGAT INOVADORES FORNECEM TEORES DE ÁCIDO OLEICO E ÓLEO
SIGNIFICATIVAMENTE MAIS ALTOS EM EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA QUE CA-
DGAT1***

[0209] Quatro genes DGAT inovadores (CA-DGAT1-A2, CA-DGAT1-C9, CA-DGAT1-C10 e CA-DGAT1-C11) que fornecem alto teor de óleo quando expressos em levedura, mais o gene CA-DGAT1*, foram expressos de forma ectópica em embriões somáticos de soja sob o controle do promotor de

subunidade α' de β -conglícinina de soja utilizando os métodos do Exemplo 3.

[0210] O teor de óleo de embriões somáticos de soja foi determinado por meio de NMR utilizando um analisador de NMR Maran Ultra (Resonance Instruments Ltd., Whitney, Oxfordshire, Reino Unido). As amostras foram colocadas em tubos de polipropileno de 2 ml previamente pesados (Corning Inc., Corning NY, Estados Unidos; Peça nº 430917) marcados anteriormente com identificadores de código de barras exclusivos. As amostras foram colocadas em seguida em transportadores com 96 lugares e processadas ao longo da série de etapas a seguir por um sistema robótico Adept Cobra 600 SCARA:

1. pegar tubo (o braço robótico foi equipado com um dispositivo de tomada a vácuo);
2. ler código de barras;
3. expor o tubo a um dispositivo antiestático;
4. pesar o tubo (contendo a amostra) até precisão de 0,0001 g.
5. leitura de NMR; medida como a intensidade do eco de centrifugação de prótons 1 mseg após a aplicação de um sinal de 22,95 MHz à amostra (foram recolhidos dados para 32 varreduras de NMR por amostra);
6. devolver o tubo para a prateleira; e
7. repetir o processo com o tubo seguinte.

[0211] Os códigos de barra, pesos dos tubos e leituras de NMR foram registrados por um computador conectado ao sistema. O peso da amostra foi determinado subtraindo-se o peso do tubo de polipropileno do peso do tubo que contém a amostra.

[0212] O teor de óleo foi calculado conforme segue:

$$\% \text{ óleo (\% com base em peso)} = \frac{(\text{sinal de NMR/peso da amostra (g)}) - 70,58}{351,45}$$

[0213] Os parâmetros de calibragem foram determinados por

meio de pesagem precisa de amostras de óleo de soja (que variam de 0,0050 a 0,0700 g em intervalos de cerca de 0,0050 g; pesados até uma precisão de 0,0001 g) em tubos Corning (vide acima) e sua submissão a análise NMR. Foi estabelecida uma curva de calibragem entre teor de óleo e valor NMR.

[0214] Os resultados da análise de óleo são apresentados na Tabela 10 e na Figura 3. Observando-se os valores médios, todos os quatro genes DGAT inovadores forneceram teor de óleo mais alto que o gene CA-DGAT1* quando expressos em embriões somáticos de soja. Os valores de CA-DGAT1-C11, CA-DGAT1-C10 e CA-DGAT1-C9 de 9,0, 8,6 e 7,6% de óleo foram consideravelmente maiores que o valor CA-DGAT1* de 5,5% de óleo.

TABELA 10

TEOR DE ÓLEO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA QUE EXPRESSAM GENES DGAT

INOVADORES OU CA-DGAT1*

	CA-DGAT1*	CA-DGAT1-A2	CA-DGAT1-C9	CA-DGAT1-C10	CA-DGAT1-C11
	9,3	7,7	11,5	14,2	13,3
	9,3	7,5	10,9	13,5	13,2
	8,8	7,4	10,8	12,6	13,1
	8,1	7,4	10,6	11,5	12,7
	7,3	7,2	10,6	10,8	12,0
	7,1	7,2	10,4	10,8	11,9
	7,0	7,1	9,6	10,7	11,2
	6,8	7,1	9,3	10,6	11,0
	6,4	7,1	8,9	10,0	10,8
	6,3	7,1	8,5	10,0	10,8
	6,3	6,5	8,1	9,8	10,2
	5,6	6,4	8,1	9,7	9,9
	5,5	6,3	7,9	9,5	9,3
	5,4	6,2	7,7	9,3	9,3
	5,4	6,1	7,7	9,3	9,2
	5,1	6,1	7,6	9,0	9,2
	4,9	6,1	7,4	9,0	8,7
	4,7	6,1	7,2	8,9	8,4
	4,6	5,8	7,0	8,7	8,4
	4,6	5,8	6,7	8,2	7,9
	4,5	5,7	6,2	8,1	7,9
	4,1	5,7	6,1	7,9	7,2

	CA-DGAT1*	CA-DGAT1-A2	CA-DGAT1-C9	CA-DGAT1-C10	CA-DGAT1-C11
	4,1	5,3	5,9	6,8	7,1
	4,1	5,2	5,5	6,3	7,0
	4,1	4,9	5,5	5,9	6,9
	4,0	4,5	5,3	5,7	6,8
	4,0	4,4	5,1	5,4	6,4
	3,9	4,1	5,1	4,6	5,8
	3,7	3,5	4,9	4,0	5,5
	3,5	3,5	4,8	3,9	4,3
	3,4	3,3	4,5	3,1	4,2
Média	5,5	6,0	7,6	8,6	9,0
Média dos dez maiores	7,6	7,3	10,1	11,5	12,0

[0215] A composição de ácidos graxos dos embriões somáticos de soja foi determinada por meio de cromatografia de gás para os quatro eventos superiores de cada um dos quatro genes de DGAT inovadores e o gene CA-DGAT1* (Tabela 11). A expressão de cada DGAT inovador resultou em mais 18:1 e 18:0 e menos 18:2 e 16:0 que o observado com a expressão de CA-DGAT1*. A expressão de gene DGAT inovador também resultou em menos 18:3 que o observado com a expressão de CA-DGAT1*, com exceção de DGAT A2 inovador.

TABELA 11

COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA QUE EXPRESSAM GENES CA-DGAT1* ou DGAT INOVADORES

DGAT	% 16:0	% 18:0	% 18:1	% 18:2	% 18:3
CA-DGAT1*	15,2	4,4	21,0	49,1	10,3
CA-DGAT1*	17,5	4,0	15,5	51,8	11,3
CA-DGAT1*	16,9	3,9	17,6	49,9	11,6
CA-DGAT1*	14,2	5,4	23,6	45,0	11,8
Média de CA-DGAT1*	16,0	4,4	19,4	48,9	11,3
CA-DGAT1-A2	15,3	4,6	22,4	46,5	11,2
CA-DGAT1-A2	14,4	5,9	25,1	42,0	12,7
CA-DGAT1-A2	14,3	6,2	23,4	43,6	12,5
CA-DGAT1-A2	15,3	6,0	27,2	40,1	11,4

DGAT	% 16:0	% 18:0	% 18:1	% 18:2	% 18:3
Média de CA-DGAT1-A2	14,8	5,7	24,5	43,0	11,9
CA-DGAT1-C9	12,9	6,8	32,2	40,0	8,1
CA-DGAT1-C9	14,5	4,6	20,9	49,9	10,0
CA-DGAT1-C9	14,1	6,0	27,7	43,3	8,9
CA-DGAT1-C9	14,0	6,3	30,5	40,0	9,1
Média de CA-DGAT1-C9	13,9	5,9	27,8	43,3	9,0
CA-DGAT1-C10	13,6	5,5	29,6	44,1	7,3
CA-DGAT1-C10	13,6	5,4	28,6	44,9	7,5
CA-DGAT1-C10	13,4	5,0	30,0	44,1	7,5
CA-DGAT1-C10	14,3	6,4	25,6	44,9	8,8
Média de CA-DGAT1-C10	13,7	5,6	28,5	44,5	7,8
CA-DGAT1-C11	14,3	4,3	23,8	48,7	8,8
CA-DGAT1-C11	13,5	4,8	29,2	43,4	9,2
CA-DGAT1-C11	13,2	5,2	29,5	43,5	8,7
CA-DGAT1-C11	14,2	4,9	26,9	45,6	8,5
Média de CA-DGAT1-C11	13,8	4,8	27,4	45,3	8,8

[0216] Os dados das Tabelas 10 e 11 demonstram que genes DGAT inovadores identificados por meio de seleção em busca de alto teor de óleo em levedura geram teores de ácido oleico e óleo mais altos quando expressos em embriões somáticos de soja que o gene CA-DGAT1*. Genes DGAT inovadores adicionais podem ser testados por meio de expressão ectópica em embriões somáticos de soja e os genes DGAT inovadores mais promissores podem ser expressos em sementes de soja para fornecer aumentos do teor de óleo e ácido oleico.

EXEMPLO 7

SEQUÊNCIAS DE GENES DGAT INOVADORES QUE FORNECEM ALTO TEOR DE ÓLEO

EM LEVEDURA

[0217] Foram determinadas sequências de DNA para 63 dos genes DGAT inovadores que forneceram teor de óleo mais alto em levedura

que o obtido com CA-DGAT1*. As sequências de aminoácidos correspondentes foram deduzidas das sequências de DNA. As sequências de aminoácidos e de DNA dos DGATs inovadores são apresentadas como SEQ ID Nº 25 a SEQ ID Nº 150. Um resumo parcial das substituições de aminoácidos pode ser observado no alinhamento de sequências de DGAT apresentado na Figura 5. O número médio de substituições observado nos 63 DGATs inovadores foi de 10 e o número máximo foi de 19 (observado em CA-DGAT1-J34). Apenas dois dos 63 DGATs inovadores apresentaram menos de quatro substituições de aminoácidos, em que CA-DGAT1-F19 contém 1 e CA-DGAT1-F8 contém 2. Considerando todos os 63 DGATs inovadores, 115 substituições diferentes estavam presentes em um total de 104 posições diferentes (ou seja, dois tipos de substituições estavam presentes em onze posições). Das 115 substituições diferentes, 53 foram observadas apenas uma vez, 62 foram observadas pelo menos duas vezes, 56 foram observadas pelo menos três vezes e 50 foram observadas pelo menos quatro vezes. A substituição mais frequentemente observada foi F514S, que estava presente em 36 dos 63 DGATs inovadores.

[0218] As 115 substituições diferentes observadas em sequências de DGAT inovadoras são: D5G, P7L, G11D, T12A, T18A, H30P, N31A, E34A, T45A, T46A, P48S, P48A, D49S, D49N, G51D, N52D, V54K, V58A, R59T, D66S, S68A, S68P, S73T, S73G, S79N, R80K, E86N, E86D, S87N, N93S, G97D, T109M, A112T, K115Q, Y118L, P123A, A124T, I128V, S135T, F139L, F139S, H143R, L146P, V155I, I162V, K174E, S181A, S181T, R182G, L184S, M191V, P197V, I198V, F199L, F204S, V205M, Q211T, K213R, P218H, L222V, R241K, L247V, T251V, M253V, A256S, C257S, Y266S, T267A, D281E, N288D, N288S, D293E, Y294N, S299T, K301N, M307V, V308L, I324V, S327G, V329L, V329M, Q332R, V334L, I337V, I338V, I346M, E348K, K356Q, K363N, Y368H, A369V, L385F, C390S, L399V, E409G, K412E, H432Y, M435V, V436I,

V436R, G451A, A457S, V460A, I475M, C486F, V488I, V491L, R502K, S504T, N508S, F514S, L518V, L531V, N533S e N533D.

[0219] Do total de 115 substituições observadas, as 62 substituições que foram observadas pelo menos duas vezes são: T12A, T18A, H30P, N31A, P48S, D49S, G51D, N52D, R59T, D66S, S68A, S73T, S79N, E86N, S87N, Y118L, P123A, I128V, F139L, V155I, S181A, L184S, P197V, I198V, V205M, Q211T, P218H, L222V, R241K, L247V, T251V, A256S, C257S, Y266F, T267A, D281E, N288D, D293E, Y294N, S299T, K301N, V308L, S327G, V329L, V334L, I337V, I338V, K356Q, K363N, C390S, L399V, V436I, G451A, A457S, I475M, C486F, V488I, V491L, R502K, F514S, L518V e L531V.

EXEMPLO 8

TRANSFERÊNCIA DE SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS DE DGAT DE AVELÃ

INOVADOR EM DGAT DE SOJA

[0220] Os genes DGAT inovadores CA-DGAT1-C9, CA-DGAT1-C10 e CA-DGAT1-C11 foram muito eficientes no aumento do teor de óleo e oleico em embriões somáticos de soja (Tabelas 10 e 11). Algumas das substituições de aminoácidos presentes nesses DGATs de avelã inovadores altamente eficientes foram, portanto, transferidas para DGAT de soja para determinar se essas mesmas substituições poderiam aumentar a eficácia de DGAT de soja para aumento do teor de óleo ou oleico. As substituições que foram transferidas encontram-se resumidas na Tabela 12. O gene DGAT de soja sem substituições é denominado GM-DGAT1 e o DNA correspondente e as sequências de aminoácidos deduzidas são apresentadas como SEQ ID N° 152 e 153. Os quatro genes DGAT de soja inovadores são denominados GM-DGAT1-C9 (SEQ ID N° 154 e 155), GM-DGAT1-C10 (SEQ ID N° 156 e 157), GM-DGAT1-C11 (SEQ ID N° 158 e 159) e GM-DGAT1-C9C10C11 (SEQ ID N° 160 e 161). Essas quatro proteínas DGAT de soja inovadoras continham 5, 5, 11 e 14 substituições de aminoácidos, respectivamente.

TABELA 12**SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS EM DGAT DE AVELÃ INOVADOR E SUBSTITUIÇÕES****CORRESPONDENTES ELABORADAS EM DGAT DE SOJA**

Algumas substituições observadas em genes DGAT de avelã inovadores CA-DGAT1-C9, CA-DGAT1-C10 ou CA-DGAT1-C11	Substituições elaboradas em DGAT de soja inovador GM-DGAT1-C9	Substituições elaboradas em DGAT de soja inovador GM-DGAT1-C10	Substituições elaboradas em DGAT de soja inovador GM-DGAT1-C11	Substituições elaboradas em DGAT de soja inovador GM-DGAT1-C9C10C11
S79N			S58N	S58N
S181A	S146A	S146A	S146A	S146A
V205M		I170M		I170M
R241K	R206K		R206K	R206K
Y266F			Y231F	Y231F
D293E		D258E		D258E
S299T			S264T	S264T
V308L	V273L		V273L	V273L
I338V			I303V	I303V
L399V	L364V		L364V	L364V
A457S		A422S		A422S
I475M			I440M	I440M
R502K			R467K	R467K
L518V	L483V	L483V	L483V	L483V

[0221] GM-DGAT1-C9 (SEQ ID N° 154 e 155), GM-DGAT1-C10 (SEQ ID N° 156 e 157), GM-DGAT1-C11 (SEQ ID N° 158 e 159) e GM-DGAT1-C9C10C11 (SEQ ID N° 160 e 161) foram sintetizados pela GENEART AG (Regensburg, Alemanha) com locais de enzima de restrição NotI laterais à sequência de genes otimizada por códons (antes do códon de início e depois do códon de parada). Além disso, foram adicionados três nucleotídeos (ACC) entre o NotI na extremidade 5' de gene otimizado por códons e o códon de início ATG em todos os casos.

[0222] Os fragmentos de NotI que contêm cada sequência de gene DGAT sintetizada foram clonados no local NotI do vetor de expressão de soja pKR72 (SEQ ID N° 178; descrito na Patente PCT n° WO 04071467, publicada em 26 de agosto de 2004) que contém um local de restrição de NotI, ladeado pelo promotor para a subunidade α' de β -conglucina (Beachy *et al*,

EMBO J. 4: 3047-3053 (1985)) e a região de término de transcrição 3' do gene faseolina (Doyle *et al*, *J. Biol. Chem.* 261: 9228-9238 (1986)), de forma a permitir forte expressão específica de tecido nas sementes de soja de genes clonados no local NotI. As sequências de vetor que contêm sequências do tipo selvagem e que sofreram mutação encontram-se resumidas na Tabela 13.

[0223] Cultivos de suspensão embriogênica de soja (cv. Jack) foram transformados com os vetores descritos na Tabela 13, os eventos foram selecionados e embriões somáticos foram amadurecidos conforme descrito no Exemplo 3. Os números de experimento para cada experimento também encontram-se resumidos na Tabela 13.

TABELA 13

RESUMO DE GMDGAT1s DO TIPO SELVAGEM E MUTANTES, VETORES DE EXPRESSÃO DE SOJA CORRESPONDENTES E NOMES DE EXPERIMENTOS

CORRESPONDENTES

Gene	nt SEQ ID Nº	aa SEQ ID Nº	Vetor de expressão	Vetor SEQ ID Nº	Número do experimento
GM-DGAT1	152	153	pKR1466	179	MSE2515
GM-DGAT1-C9	154	155	pKR1515	180	MSE2516
GM-DGAT1-C10	156	157	pKR1516	181	MSE2517
GM-DGAT1-C11	158	159	pKR1517	182	MSE2518
GM-DGAT1-C9C10C11	160	161	pKR1520	183	MSE2519

[0224] Cerca de trinta eventos para cada experimento foram criados em transformações com os vetores descritos na Tabela 13. Todos os embriões gerados para um dado evento foram colhidos a granel e processados conforme segue. Os embriões foram congelados sobre gelo seco ou por meio de incubação em um congelador a -80 °C por duas horas, seguida por liofilização por 48 horas. Os embriões secos foram moídos em um pó fino

utilizando uma ampola genomoedora (1/2" x 2" policarbonato) e uma bola de aço (SPEX Centriprep (Metuchen NJ, Estados Unidos). O tempo de moagem foi de 30 seg a 1450 oscilações por minuto.

[0225] Para análise de ácidos graxos, uma concha pequena (cerca de 5 mg) de pó pulverizado para cada evento foi transferida para uma ampola GC de vidro. Para transesterificação, 50 µl de hidróxido de trimetilsulfônio (TMSH) e 0,5 ml de hexano foram adicionados a cada ampola e incubados por trinta minutos à temperatura ambiente mediante agitação. Metil ésteres de ácidos graxos (1 µl injetado a partir de camada de hexano) foram separados e quantificados utilizando um Cromatógrafo de Gás Hewlett-Packard 6890 equipado com uma coluna capilar de sílica fundida Omegawax 320 (Catálogo nº 24152, Supelco Inc.). A temperatura do forno foi programada para manter-se a 220 °C por 2,6 minutos, aumentar para 240 °C a 20 °C/min e, em seguida, manter-se por 2,4 minutos adicionais. O gás veículo foi fornecido por um gerador de hidrogênio Whatman. Os tempos de retenção foram comparáveis aos de metil ésteres de padrões disponíveis comercialmente (Nu-Chek Prep, Inc.).

[0226] As medições de concentração de óleo para cada evento de cada experimento foram determinadas sobre os pós de embriões secos restantes (cerca de 20 a 200 mg cada) utilizando NMR conforme descrito no Exemplo 6. Os resultados de concentração de óleo e perfil de ácidos graxos (concentração de ácidos graxos expressa sobre um percentual em peso do total de ácidos graxos) para MSE2515, MSE2516, MSE2517, MSE2518 e MSE2519 são exibidos nas Tabelas 14, 15, 16, 17 e 18, respectivamente. Também são exibidas as concentrações médias em óleo e as concentrações médias em ácido graxo (expressas na forma de % em peso do total de ácidos graxos) para todos os eventos, bem como as concentrações médias para os cinco eventos superiores que possuem concentrações de óleo mais altas.

TABELA 14**CONCENTRAÇÕES DE ÓLEO E PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS PARA EVENTOS DE****MSE2515**

MSE2515 (GmDGAT1)						
Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	% óleo
2515-14	16,7	5,6	23,8	38,4	15,3	6,4
2515-13	17,0	5,3	21,7	39,5	16,5	5,9
2515-6	16,8	5,5	23,2	37,7	16,9	5,1
2515-11	17,5	5,4	23,0	37,8	16,2	5,0
2515-19	17,9	4,9	18,1	40,9	18,2	4,8
2515-28	17,3	5,1	16,0	42,5	19,1	4,7
2515-2	16,9	5,2	21,3	39,5	17,2	4,6
2515-10	17,6	5,0	16,6	42,2	18,6	4,6
2515-24	15,9	5,0	18,6	39,9	20,6	4,4
2515-20	17,9	4,8	17,7	39,2	20,4	4,3
2515-17	17,0	6,3	20,5	36,9	19,2	4,3
2515-12	17,4	5,1	17,2	38,7	21,7	4,2
2515-7	18,7	4,4	14,1	42,3	20,5	4,2
2515-29	16,5	4,6	15,9	38,6	24,4	4,1
2515-15	18,0	5,1	16,8	42,5	17,7	4,1
2515-9	17,8	4,3	14,3	42,5	21,2	4,0
2515-22	17,2	5,5	18,9	39,9	18,5	4,0
2515-5	17,6	4,6	16,6	39,5	21,7	4,0
2515-4	19,2	5,5	14,8	36,9	23,6	3,9
2515-18	18,0	6,1	20,9	38,2	16,9	3,9
2515-16	16,5	4,5	19,1	38,2	21,4	3,9
2515-8	17,4	5,0	17,2	40,4	20,0	3,8
2515-21	17,1	4,2	14,0	39,6	25,1	3,8
2515-27	16,0	4,4	17,5	40,3	21,8	3,6
2515-31	17,6	4,5	13,0	40,9	24,0	3,6
2515-25	17,0	6,3	19,7	37,1	20,0	3,6
2515-26	18,0	4,5	15,2	39,4	22,9	3,5
2515-23	17,4	4,7	14,8	40,9	22,2	3,2
2515-1	18,4	4,2	13,5	41,7	22,2	3,2
2515-30	16,3	4,0	15,1	40,7	24,0	2,9
2515-3	20,1	4,5	10,7	41,1	23,5	2,5
Média	17,4	5,0	17,4	39,8	20,4	4,1
Média dos 5 superiores	17,2	5,3	22,0	38,9	16,6	5,4

TABELA 15**CONCENTRAÇÕES DE ÓLEO E PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS PARA EVENTOS DE****MSE2516**

MSE2516 (GmDGAT1-C9)						
Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	% óleo
2516-8	16,3	7,1	26,4	36,5	13,7	7,1
2516-28	16,9	6,9	25,2	36,8	14,3	6,7
2516-4	16,0	7,0	24,5	37,1	15,3	6,6
2516-16	16,0	5,4	17,8	45,9	14,8	6,2
2516-19	16,4	6,0	24,8	37,6	15,1	6,1
2516-25	17,2	5,4	19,3	39,4	18,7	5,7
2516-27	16,1	6,5	22,3	38,6	16,4	5,7
2516-6	17,6	5,3	17,2	38,7	21,1	4,8
2516-1	17,2	6,3	20,7	37,9	17,9	4,8
2516-30	16,3	6,2	21,0	38,9	17,7	4,7
2516-13	15,6	5,6	19,5	39,4	19,9	4,5
2516-22	17,1	5,2	17,8	39,9	19,9	4,3
2516-26	17,1	6,0	20,2	38,1	18,6	4,3
2516-12	17,7	5,7	18,8	39,1	18,8	4,3
2516-5	16,9	5,3	16,2	41,7	20,0	4,2
2516-15	17,6	3,8	15,2	42,1	21,3	4,1
2516-29	16,2	5,1	18,8	38,6	21,2	3,9
2516-9	17,3	5,8	19,9	39,0	18,1	3,8
2516-23	16,8	5,6	18,9	37,3	21,3	3,8
2516-3	16,6	5,3	17,4	39,8	21,0	3,7
2516-21	16,6	6,0	19,5	38,0	19,9	3,6
2516-10	16,3	4,5	15,5	39,9	23,8	3,6
2516-2	16,5	5,4	17,3	38,0	22,9	3,5
2516-11	17,7	4,9	14,2	41,6	21,6	3,5
2516-18	16,5	5,5	18,6	38,9	20,6	3,5
2516-7	19,0	5,0	14,7	38,8	22,5	3,4
2516-24	17,9	6,2	20,7	36,6	18,6	3,2
2516-17	17,0	4,2	13,4	41,2	24,2	2,9
Média	16,9	5,6	19,1	39,1	19,3	4,5
Média dos 5 superiores	16,3	6,5	23,8	38,8	14,6	6,5

TABELA 16**CONCENTRAÇÕES DE ÓLEO E PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS PARA EVENTOS DE****MSE2517**

MSE2517 (GmDGAT1-C10)						
Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	% óleo
2517-4	15,1	5,8	28,1	40,6	10,4	10,5
2517-15	15,9	5,8	26,3	39,4	12,6	9,1
2517-7	16,1	5,5	25,4	40,9	12,0	9,0
2517-9	18,0	5,7	23,5	41,0	11,8	8,2
2517-17	15,9	7,2	30,7	34,8	11,4	7,8
2517-20	17,2	5,9	22,4	40,1	14,5	7,2
2517-27	18,2	4,3	17,0	43,7	16,7	6,3
2517-8	16,6	6,3	25,4	37,5	14,1	6,0
2517-19	16,5	4,4	17,0	44,0	18,3	5,7
2517-1	16,4	5,3	17,4	42,4	18,5	5,5
2517-12	17,0	5,1	18,4	42,6	17,0	5,2
2517-23	16,6	5,6	23,1	38,8	15,9	4,9
2517-28	17,2	5,2	23,5	36,4	17,6	4,9
2517-5	16,2	5,1	18,7	40,8	19,1	4,9
2517-14	18,6	6,3	22,2	36,9	15,9	4,8
2517-18	17,4	6,0	20,8	39,1	16,8	4,2
2517-2	18,6	4,7	13,9	42,6	20,3	4,1
2517-21	16,3	4,6	20,1	40,4	18,6	4,0
2517-10	16,6	6,6	26,5	33,8	16,4	3,9
2517-24	18,8	5,7	19,7	38,1	17,7	3,8
2517-31	16,5	4,2	19,1	39,5	20,8	3,7
2517-26	18,7	4,2	12,7	40,1	24,3	3,6
2517-25	18,1	5,2	17,5	40,5	18,6	3,6
2517-6	17,0	4,3	16,0	40,8	21,9	3,3
2517-11	17,7	4,6	15,1	40,5	22,1	3,3
2517-29	17,3	4,5	15,9	40,1	22,1	3,1
2517-16	17,5	3,9	11,3	42,4	24,9	3,0
2517-13	17,6	5,0	18,8	37,4	21,1	2,6
2517-30	18,0	4,6	15,5	39,5	22,4	2,5
2517-22	17,1	4,4	14,9	39,8	23,7	2,4
Média	17,2	5,2	19,9	39,8	17,9	5,0
Média dos 5 superiores	16,2	6,0	26,8	39,3	11,7	8,9

TABELA 17**CONCENTRAÇÕES DE ÓLEO E PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS PARA EVENTOS DE****MSE2518**

MSE2518 (GmDGAT1-C11)						
Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	% óleo
2518-30	15,7	7,6	29,0	35,1	12,6	7,6
2518-18	15,9	8,6	31,4	33,6	10,4	7,5
2518-3	15,9	6,3	25,1	38,4	14,3	6,6
2518-4	16,7	7,0	24,1	36,5	15,7	6,5
2518-12	16,2	6,2	24,0	38,0	15,6	6,4
2518-17	15,5	5,6	24,0	38,5	16,3	6,2
2518-11	16,5	5,5	19,2	40,8	17,9	5,9
2518-23	16,2	6,7	24,1	36,6	16,4	5,9
2518-19	15,6	5,7	19,5	41,1	18,0	5,6
2518-21	16,6	6,4	21,8	37,6	17,7	5,4
2518-9	16,8	6,5	23,1	37,0	16,6	5,2
2518-27	15,3	5,9	21,1	39,6	18,2	5,2
2518-14	16,9	5,6	19,9	39,5	18,1	5,1
2518-2	16,9	5,1	19,2	40,0	18,7	5,0
2518-26	17,0	5,0	15,4	41,4	21,2	4,5
2518-16	17,8	4,0	12,5	39,2	26,5	4,3
2518-24	17,1	5,7	18,2	38,3	20,7	4,0
2518-13	16,4	5,7	18,5	39,0	20,4	4,0
2518-22	17,3	4,9	17,6	38,9	21,4	3,9
2518-8	16,9	6,6	23,0	36,4	17,1	3,9
2518-5	15,9	5,2	17,0	40,5	21,4	3,7
2518-6	17,0	4,6	13,9	40,6	23,9	3,7
2518-15	46,5	4,8	16,6	39,2	23,0	3,7
2518-25	16,8	5,2	18,2	39,8	19,9	3,5
2518-10	17,1	6,5	22,3	35,9	18,2	3,5
2518-29	16,9	5,6	17,9	38,7	21,0	3,4
2518-20	18,1	5,2	16,6	37,5	22,6	3,3
Média	16,6	5,8	20,5	38,4	18,7	4,9
Média dos 5 superiores	16,1	7,2	26,7	36,3	13,7	6,9

TABELA 18**CONCENTRAÇÕES DE ÓLEO E PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS PARA EVENTOS DE****MSE2519**

MSE2519 (GmDGAT1-C9C10C11)						
Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	% óleo
2519-17	16,8	8,6	30,4	35,3	8,9	11,3
2519-20	15,2	6,3	28,1	39,6	10,8	11,2
2519-9	15,5	7,2	29,7	36,9	10,7	10,5
2519-26	15,9	7,0	28,6	37,6	11,0	10,3
2519-1	15,5	7,3	28,4	37,5	11,3	10,0
2519-5	15,7	7,8	29,1	36,7	10,8	9,8
2519-23	15,4	6,1	26,6	40,4	11,6	9,5
2519-10	15,5	6,6	27,3	38,4	12,2	9,4
2519-16	16,5	6,3	25,4	39,4	12,3	9,3
2519-3	14,9	8,2	29,5	36,6	10,8	8,8
2519-11	15,8	5,1	21,8	43,9	13,4	8,6
2519-8	14,8	7,6	24,4	41,5	11,8	8,5
2519-27	15,4	6,5	25,7	39,9	12,4	8,4
2519-19	15,8	7,9	27,5	36,3	12,5	8,1
2519-18	15,9	7,3	25,5	37,9	13,5	7,1
2519-24	15,5	5,8	20,5	41,0	17,1	6,0
2519-13	17,2	5,3	19,4	40,4	17,7	5,9
2519-28	16,0	6,2	22,3	38,7	16,7	5,8
2519-21	15,9	6,1	20,4	39,2	18,4	4,8
2519-30	16,9	6,5	20,7	38,9	17,1	4,7
2519-29	16,7	5,6	19,9	39,9	17,9	4,6
2519-25	17,0	6,0	19,7	38,8	18,5	4,4
2519-2	17,2	6,2	24,7	37,3	14,6	4,4
2519-12	16,5	5,3	17,8	39,7	20,7	4,3
2519-6	16,1	4,4	14,7	41,6	23,3	4,1
2519-4	17,0	5,5	19,0	39,3	19,3	4,0
2519-22	16,0	4,7	15,9	42,0	21,3	3,7
2519-7	17,0	5,3	16,1	39,3	22,3	3,6
2519-15	17,0	6,5	20,8	36,8	18,8	3,2
2519-14	18,2	4,4	12,6	40,0	24,9	2,7
Média	16,2	6,3	23,1	39,0	15,4	6,9
Média dos 5 superiores	15,8	7,3	29,0	37,4	10,5	10,7

[0227] As concentrações médias de óleo para todos os eventos para MSE2515, MSE2516, MSE2517, MSE2518 e MSG2519 são de 4,1%, 4,5%, 5,0%, 4,9% e 6,9%, respectivamente. As concentrações médias de óleo

para os cinco eventos superiores que possuem concentrações de óleo mais altas para MSE2515, MSE2516, MSE2517, MSE2518 e MSE2519 são de 5,4%, 6,5%, 8,9%, 6,9% e 10,7%, respectivamente.

[0228] A concentração de óleo plotada contra a concentração de ácido oleico para MSE2515, MSE2516, MSE2517, MSE2518 e MSE2519 é exibida na Figura 6.

[0229] As Tabelas 14 a 18 e a Figura 6 demonstram que a expressão de GmDGAT1-C9 e GmDGAT1-C11 causa um pequeno aumento das concentrações de óleo e ácido oleico em embriões somáticos sobre o observado para GmDGAT1. GmDGAT1-C10 apresentou um efeito maior e GmDGAT1-C9C10C11 apresentou o maior efeito sobre as concentrações de óleo e ácido oleico em comparação com GmDGAT1 em embriões somáticos.

EXEMPLO 9

EXPRESSÃO ECTÓPICA DE GENES DGAT INOVADORES EM SEMENTES DE SOJA

[0230] O método de expressão de genes DGAT em embriões somáticos de soja sob o controle do promotor da subunidade α' de β -conglitinina de soja foi descrito no Exemplo 3. O presente exemplo descreve o método de expressão de genes DGAT em sementes de soja, e não em embriões somáticos.

[0231] Linhagens de soja transgênicas são geradas por meio do método de bombardeio de disparador de partículas (Klein *et al*, *Nature (London)* 327: 70-73 (1987); Patente Norte-Americana nº 4.945.050) utilizando um instrumento BIORAD Biolistic PDS1000/He e DNA de plasmídeo conforme descrito no Exemplo 3. As soluções estoque e os meios a seguir são utilizados para transformação e regeneração de plantas de soja:

SOLUÇÕES ESTOQUE

[0232] Solução estoque 100 X Sulfato:

37,0 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,69 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,86 g de

ZnSO₄.7H₂O e 0,0025 g de CuSO₄.5H₂O.

[0233] Solução estoque 100 X Haletos:

30,0 g de CaCl₂.2H₂O, 0,083 g de KI e 0,0025 g de CoCl₂.6H₂O.

[0234] Solução estoque 100 X P, B, Mo:

18,5 g de KH₂PO₄, 0,62 g de H₃BO₃ e 0,025 g de Na₂MoO₄.2H₂O.

[0235] Solução estoque 100 X Fe EDTA:

3,724 g de Na₂EDTA e 2,784 g de FeSO₄.7H₂O.

[0236] Solução estoque 2,4-D:

10 mg/ml de Solução estoque 1000 X Vitamina B5: 10,0 g de mioinositol, 0,10 g de ácido nicotínico, 0,10 g de piridoxina HCl e 1 g de tiamina.

MEIOS (POR LITRO)

[0237] SB196: 10 ml de cada uma das soluções estoque acima, 1 ml de solução estoque de Vitamina B5, 0,463 g de (NH₄)₂SO₄, 2,83 g de KNO₃, 1 ml de solução estoque de 2,4-D, 1 g de asparagina e 10 g de sacarose, pH 5,7.

[0238] SB103: 1 pacote de mistura de sais Murashige & Skoog, 1 ml de solução estoque Vitamina B5, 750 mg de hexa-hidrato de MgCl₂, 60 g de maltose e 2 g de gelrita, pH 5,7.

[0239] SB166: SB103 suplementado com 5 g por litro de carvão ativado.

[0240] SB71-4: sais B5 de Gamborg, 1 ml de solução estoque de vitamina B5, 30 g de sacarose e 5 g de Agar TC, pH 5,7.

[0241] Para preparar tecido para transformação, cultivos de suspensão embriogênica de soja são mantidos em 35 ml de meio líquido (SB196) em um agitador giratório (150 rpm) a 28 °C com luzes fluorescentes que fornecem um ciclo de 16 horas de dia e 8 horas de noite. Os cultivos são subcultivados a cada duas semanas por meio de inoculação de cerca de 35 mg

de tecido em 35 ml de meios líquidos novos.

[0242] Em procedimentos de bombardeio com disparador de partículas, é possível utilizar 1) DNA plasmídeo inteiro; ou 2) fragmentos de DNA que contêm apenas o(s) conjunto(s) de expressão de DNA recombinante de interesse, purificados. Para cada dezessete transformações de bombardeio, são preparados 85 l de suspensão que contêm de 1 a 90 picogramas (pg) de DNA de plasmídeo por par de bases de cada plasmídeo de DNA. Os plasmídeos de DNA recombinante são precipitados sobre partículas de ouro conforme segue. O DNA em suspensão é adicionado a 50 µl de uma suspensão de 20 a 60 mg/ml de partículas de ouro de 0,6 µm e combinado em seguida com 50 µl de CaCl₂ (2,5 M) e 20 µl de espermidina (0,1 M). A mistura é turbilhonada por cinco segundos, centrifugada em um microcentrifugador por cinco segundos e o sobrenadante é removido. As partículas revestidas com DNA são lavadas em seguida por uma vez com 150 µl de etanol a 100%, turbilhonadas, centrifugadas novamente em um microcentrifugador e suspensas mais uma vez em 85 µl de etanol anidro. Cinco microlitros das partículas de ouro revestidas com DNA são carregadas em seguida sobre cada disco macroveículo.

[0243] Cerca de 150 a 250 mg de cultivo de suspensão com duas semanas de idade são colocados em uma placa de Petri vazia de 60 mm x 15 mm e o líquido residual é removido do tecido utilizando uma pipeta. O tecido é colocado a cerca de 8,9 cm de distância da tela de retenção e cada placa de tecido é bombardeada uma vez. A pressão de ruptura da membrana é definida em 650 psi e a câmara é evacuada a -711 mmHg. Três placas são bombardeadas e, após o bombardeio, o tecido de cada placa é dividido entre dois frascos, colocado de volta em meio líquido e cultivado conforme descrito acima.

[0244] Sete dias após o bombardeio, o meio líquido é trocado com meio SB196 novo suplementado com 30 a 50 mg/l de higromicina. O meio seletivo é renovado em seguida a cada uma ou duas semanas. Sete semanas

após o bombardeio, observa-se o crescimento de tecido transformado verde brilhante a partir de conjuntos embriogênicos cloróticos ou necróticos não transformados. Tecido verde isolado é removido e inoculado em cavidades individuais em placas de cultivo com seis cavidades para gerar novos cultivos de suspensão embriogênica transformados e propagados de forma clonal. Desta forma, cada nova linhagem é tratada como um evento de transformação independente em uma cavidade individual.

[0245] Essas suspensões podem ser mantidas em seguida como suspensões de embriões reunidas em um estágio de desenvolvimento imaturo por meio de subcultivo ou podem ser regeneradas em plantas inteiras por meio de amadurecimento e germinação de embriões somáticos individuais.

[0246] Após duas semanas em cavidades de células individuais, conjuntos embriogênicos transformados são removidos de cultivo líquido e colocados sobre meio solidificado (SB166) que não contém hormônios nem antibióticos por uma semana. Os embriões são cultivados a 26 °C com lâmpadas incandescentes e fluorescentes misturadas em um cronograma de 16 horas de dia e 8 horas de noite. Após uma semana, os cultivos são transferidos para meio SB103 e mantidos nas mesmas condições de crescimento por três semanas adicionais.

[0247] Os embriões somáticos tornam-se apropriados para germinação após quatro semanas e são removidos em seguida do meio de amadurecimento e secos em placas de Petri vazias por um a cinco dias.

[0248] Os embriões secos são plantados em seguida em meio SB71-4, no qual foram mantidos em germinação sob as mesmas condições de luz e temperatura descritas acima. Embriões germinados são transferidos para solo estéril e cultivados até a maturidade para produção de sementes. O teor de óleo e a composição de ácido graxo da semente são determinados

conforme descrito em exemplos anteriores.

EXEMPLO 10

TRANSFERÊNCIA DE SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS DE DGAT DE AVELÃ INOVADOR EM DGAT DE MILHO AUMENTA A ATIVIDADE ESPECÍFICA DE DGAT DE MILHO

[0249] Seis substituições de aminoácidos frequentemente observadas em sequências de DGAT inovadoras derivadas de CA-DGAT1* foram transferidas para DGAT de milho para determinar se essas mesmas substituições poderiam aprimorar a enzima de milho. O gene DGAT de milho utilizado para este exemplo é denominado ZM-DGAT (MOD1) e corresponde a SEQ ID N° 163. A sequência de aminoácidos deste DGAT de milho é idêntica a SEQ ID N° 19 utilizado para determinação da homologia de sequências na Tabela 2 do Exemplo 1. A sequência de nucleotídeos de ZM_DGAT (MOD1), entretanto, foi alterada para reduzir o teor de GC extremamente alto na região 5' do gene e facilitar a clonagem. As seis substituições de amionácidos transferidas dos genes DAGT inovadores derivados de CA-DGAT1* são L274V, N288D, K356Q, C390S, G451A e F514S. As substituições correspondentes em DGAT de milho são L201V, N242D, K310Q, C344S, G405A e F468S. Duas das seis mutações, C344S e F468S, também foram elaboradas isoladamente e em conjunto em DGAT de milho. Os nomes, substituições de aminoácidos e SEQ ID N° para os DGATs de milho inovadores são ZM-DGAT (MOD2), F468S, SEQ ID N° 163 e 164; ZM-DGAT (MOD3), C344S, SEQ ID N° 165 e 166; ZM-DGAT (MOD4), F468S/C344S, SEQ ID N° 167 e 168 e ZM-DGAT (MOD5), L247V/N288D/K356Q/C390S/G451A/F514S, SEQ ID N° 169 e 170. A construção denominada PHP40102 que compreende o gene ZM-DGAT (MOD4) no vetor de expressão de levedura é apresentada como SEQ ID N° 171 como exemplo representativo. Após a expressão dos DGATs de milho inovadores no DGAT/PDAT de *Saccharomyces nulo*, foram realizados testes

de atividade de DGAT microsomal e Western Blot. Preparações de membrana microsomal e testes de atividade de DGAT foram realizados conforme descrito no Exemplo 2. A concentração de DAG endógena e 10 μ M de 18:1 CoA aparentemente são concentrações de saturação para esses dois substratos com todas essas enzimas de milho. Western Blots foram realizados conforme descrito no Exemplo 5, exceto pelo fato de que os anticorpos policlonais de coelho utilizados foram preparados contra o peptídeo RLRRAPSADAGDLAGD (peptídeo 2, SEQ ID Nº 177), correspondente às posições de aminoácidos 27 a 42 de DGAT de milho.

[0250] Os resultados dos testes de atividade e Western Blot são relatados na Tabela 20. Como é evidente na coluna à direita da Tabela 19, todos os DGATs de milho inovadores apresentaram maior atividade que ZM-DGAT (MOD1), após o ajuste da abundância de proteína DGAT. O DGAT de milho inovador ZM-DGAT (MOD4), que continha duas substituições de aminoácidos, apresentou atividade ajustada mais de três vezes maior que a de ZM-DGAT (MOD1). DGAT de milho inovador ZM-DGAT (MOD2) apresentou cerca de 2,4 vezes mais atividade ajustada que ZM-DGAT (MOD1) e os outros dois DGATs inovadores apresentaram cerca de duas vezes a atividade ajustada de ZM-DGAT (MOD1). Esses grandes aumentos da atividade específica de DGAT como resultado da mutagênese observado no presente para os DGATs de milho inovadores e no Exemplo 5 para os DGATs de avelã inovadores não foram relatados anteriormente. Os DGATs de milho inovadores foram menos abundantes em microsomos de levedura que a proteína ZM-DGAT (MOD1). Conforme mencionado no Exemplo 5, menos abundância pode dever-se a um nível de expressão mais baixo em levedura ou ao fato de que proporcionalmente mais das proteínas DGAT inovadoras estavam na almofada de gordura, e não na pelota microsomal, em comparação com a proteína ZM-DGAT (MOD1). Estes resultados demonstram que as substituições de

aminoácidos presentes em genes DGAT inovadores derivados do gene DGAT de avelã e identificados por meio de seleção em busca de alto teor de óleo em levedura podem aprimorar cineticamente um DGAT tipo I de uma planta diferente. Como esta transferência de substituições de aminoácidos foi bem sucedida de um DGAT dicotiledôneo para um DGAT monocotiledôneo com identidade de sequência de aminoácidos de apenas 64% (Tabela 2), pode-se esperar que a transferência de substituições de aminoácidos de DGATs inovadores derivados de DGAT de avelã para DGATs dicotiledôneos com relação mais próxima tais como os das oleaginosas soja (74% de identidade com DGAT de avelã, Tabela 2), canola ou girassol pode também ser bem sucedida.

TABELA 19**ATIVIDADE E ABUNDÂNCIA RELATIVA DE DGAT DE MILHO INOVADOR**

DGAT expresso, substituições de aminoácidos	Atividade de DGAT ¹	Abundância de DGAT em microsossomos com relação a ZM-DGAT (MOD1)	Atividade de DGAT ¹ ajustada para abundância de DGAT	Atividade de DGAT ajustada para abundância de DGAT (% de ZM-DGAT (MOD1))
ZM-DGAT (MOD1), sem substituições	1067 ± 13	1	1067	100
ZM-DGAT (MOD2), F468S	1698 ± 94	0,66	2573	241
ZM-DGAT (MOD3), C344S	1278 ± 75	0,61	2095	196
ZM-DGAT (MOD4), F468S/C344S	2507 (apenas uma réplica efetuada)	0,61	4110	385
ZM-DGAT (MOD5), F468S/C344S/L201V/N242D/K310Q/G405A	1288 ± 36	0,62	2077	195

1. A atividade é medida na forma de pmol de oleoil-CoA marcado com C14 incorporado em TAG por minuto por mg de proteína microssomal.

EXEMPLO 11

CONSTRUÇÃO DE QUIMERAS QUE COMPREENDEM GENES DGAT INOVADORES

[0251] Os polipeptídeos DGAT do tipo I de espécies de plantas superiores possuem altas identidades de sequências de aminoácidos totais, o que é evidente na Tabela 2 do Exemplo 1. A identidade de sequências, entretanto, é muito mais baixa na região N-terminal (cerca de um quinto do polipeptídeo) que no restante do polipeptídeo. A região variável N-terminal de DGAT de uma espécie de planta pode aumentar a eficácia quando expressar ectopicamente um DGAT exógeno obtido de uma espécie de planta diferente. Foram construídos genes quiméricos que codificam os 112 aminoácidos N-terminais de DGAT de milho fundido aos 381 aminoácidos C-terminais de DGAT de avelã inovador ou do tipo selvagem. A quimera de DGAT de avelã do tipo selvagem é denominada ZM-DGAT:CA-DGAT1 e corresponde a SEQ ID Nº 172 e 173. A quimera de DGAT de avelã inovadora é denominada ZM-DGAT:CA-DGAT1-C11 e corresponde a SEQ ID Nº 174 e 175. Esta quimera de DGAT inovadora é apresentada como um exemplo representativo. Quimeras similares podem ser elaboradas com qualquer um dos genes DGAT inovadores descritos na presente invenção.

EXEMPLO 12

EXPRESSÃO ECTÓPICA DE GENES DGAT INOVADORES EM MILHO

[0252] Construções que contêm um promotor oleosina de 16 kD preferido de embrião que dirige a expressão de genes DGAT inovadores são transformadas em milho por meio de infecção com *Agrobacterium*. As construções também contêm uma proteína fluorescente vermelha DS-RED dirigida por um promotor proteína de transferência de lipídios 2 (LTP2) específico de aleurona para facilitar a segregação de sementes nulas e transgênicas para análise fenotípica. Os dados de óleo e perfis de ácido graxo são obtidos a partir de sementes nulas e transgênicas.

[0253] Para transformação mediada por *Agrobacterium* de milho com cDNAs de DGAT inovadores, é empregado o método de Zhao (Patente Norte-Americana nº 5.981.840 e Patente PCT Publicada nº WO 98/32326, cujos teores são incorporados ao presente como referência). Resumidamente, embriões imaturos são isolados de milho e colocados em contato com uma suspensão de *Agrobacterium*, em que as bactérias são capazes de transferir o cDNA de DGAT, ligado operativamente a um promotor de interesse, para pelo menos uma célula de pelo menos um dos embriões imaturos (etapa 1: a etapa de infecção). Nesta etapa, os embriões imaturos são imersos em uma suspensão de *Agrobacterium* para início da inoculação. Os embriões são cultivados por um tempo com o *Agrobacterium* (etapa 2: a etapa de cocultivo). Os embriões imaturos são cultivados sobre meio sólido após a etapa de infecção. Após este período de cocultivo, é contemplada uma etapa opcional de “repouso”. Nesta etapa de repouso, os embriões são incubados na presença de pelo menos um antibiótico conhecido por inibir o crescimento de *Agrobacterium* sem a adição de um agente seletivo para transformadores de plantas (etapa 3: etapa de repouso). Os embriões imaturos são cultivados sobre meio sólido com antibiótico, mas sem um agente de seleção, para eliminação de *Agrobacterium* e para uma fase de repouso para as células infectadas. Em seguida, embriões inoculados são cultivados sobre meio que contém um agente seletivo e calo transformado em crescimento é recuperado (etapa 4: a etapa de seleção). Os embriões imaturos são cultivados sobre meio sólido com um agente seletivo, resultando no crescimento seletivo de células transformadas. O calo é regenerado em plantas em seguida (etapa 5: a etapa de regeneração) e calos cultivados sobre meio seletivo são cultivados sobre meio sólido para regenerar as plantas.

[0254] Este método de transformação foi utilizado com sucesso anteriormente para aumentar o teor de óleo e oleico em milho por meio da

expressão ectópica de DGAT de milho (Zheng *et al*, *Nature Genetics* 40: 367-372). Este mesmo método é utilizado no presente para determinar se podem ser atingidos aumentos ainda maiores dos teores de oleico ou óleo de milho por meio da expressão de genes DGAT inovadores descritos no presente. Exemplos de genes DGAT que são testados com este método são SEQ ID N° 163, 165, 167, 169, 11, 27, 49, 51, 53, 172 e 174. Os genes DGAT de dicotiledôneas podem ser otimizados por códons para milho, para aumentar o nível de expressão. Como exemplo representativo, o plasmídeo PHP36707 (Figura 4) compreende o DGAT inovador CA-DGAT1-C11 no vetor de transformação de milho.

EXEMPLO 13

EXPRESSÃO ECTÓPICA DE GENES DGAT INOVADORES EM UM FUNDO COM ALTO

TEOR DE ÁCIDO OLEICO

[0255] Óleo de avelã contém mais de 80% de ácido oleico (Cristofori *et al*, *J. Sci. Food Agric.* 88: 1091-1098). O DGAT desta espécie, portanto, pode ser especialmente eficaz em tecidos com alto teor de ácido oleico que contêm alta proporção de oleoil-CoA e dioleoil diacilglicerol como substratos durante o período de desenvolvimento de formação de óleo. Além disso, pelo menos alguns dos DGATs inovadores que fornecem alto teor de óleo em levedura podem possuir afinidade aprimorada (valores K_m ou $S_{0,5}$ mais baixos) para oleoil-CoA e dioleoil diacilglicerol, como resultado das suas numerosas substituições de aminoácidos. É de interesse, portanto, expressar os genes DGAT inovadores descritos no presente em plantas com alto teor de ácido oleico. A expressão ectópica de genes DGAT inovadores em um fundo com alto teor de ácido oleico é atingida por meio do cruzamento de linhagens de plantas transgênicas que expressam de forma ectópica esses DGATs com linhagens que possuem expressão reduzida de FAD2 (dessaturase de ácido graxo delta-12). Alternativamente, conjuntos de expressão de DGAT e conjuntos que contêm sequências de polinucleotídeos inibidoras de FAD2

podem ser transformadas simultaneamente por meio dos métodos dos Exemplos 10 e 11. Exemplos de sequências de polinucleotídeos inibidoras de FAD2 e construções inibidoras para milho incluem, mas sem limitações, as descritas no Pedido de Patente Norte-Americano Publicado nº 2005-0160494 e WO 2005/063988, integralmente incorporados ao presente como referência.

EXEMPLO 14

TESTE DE GENES DGAT DE AVELÃ INOVADORES DA BIBLIOTECA J EM EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA E TRANSFERÊNCIA DE SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS DA BIBLIOTECA J EM DGAT DE SOJA

[0256] Quatro genes DGAT inovadores (CA-DGAT1-J16, CA-DGAT1-J24, CA-DGAT1-J32 e CA-DGAT1-J37) que geraram alto teor de óleo quando expressos em levedura, mais o gene CA-DGAT1*, são expressos de forma ectópica em embriões somáticos de soja sob controle do promotor subunidade α' de β -conglucina de soja utilizando os métodos do Exemplo 3. Os perfis de ácido graxo e teor de óleo de embriões somáticos de soja são determinados conforme descrito no presente. É provável que alguns ou todos os genes DGAT inovadores da biblioteca J gerem concentrações mais altas de óleo e ácido oleico em embriões somáticos, em comparação com CA-DGAT1*. Resultados similares serão observados para esses genes quando expressos em sementes, utilizando os métodos descritos no presente.

[0257] Algumas ou todas as substituições de aminoácidos presentes nesses DGATs de avelã inovadores da biblioteca J serão transferidas para DGAT de soja, para determinar se essas mesmas substituições podem aumentar a eficácia de DGAT de soja para aumentar o teor de óleo ou oleico. As substituições que são transferidas encontram-se resumidas na Tabela 20. Os nomes, bem como DNA e sequências de aminoácidos deduzidas para os cinco genes DGAT de soja inovadores são GM-DGAT1-J16 (SEQ ID Nº 184 e 185), GM-DGAT1-J24 (SEQ ID Nº 186 e

187), GM-DGAT1-J32 (SEQ ID N° 188 e 189), DGAT1-J37 (SEQ ID N° 190 e 191) e GM-DGAT1-J16J24J32J37 (SEQ ID N° 192 e 193). Estas cinco proteínas DGAT de soja inovadoras continham 11, 11, 11, 9 e 15 substituições de aminoácidos, respectivamente. Um DNA e sequência de aminoácidos deduzida que incorpora todas as mutações descritas no Exemplo 8 da biblioteca C e aqui da biblioteca J (GM-DGAT1-Jall Call) encontram-se descritos em SEQ ID N° 194 e SEQ ID N° 195, respectivamente.

TABELA 20

SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS EM DGATs DE AVELÃ INOVADORES E AS

SUBSTITUIÇÕES CORRESPONDENTES REALIZADAS EM DGATs DE SOJA

Avelã ¹ (J16, J24, J32 ou J37)	Soja (J16)	Soja (J24)	Soja (J32)	Soja (J37)	Soja ² (J16J24J32J37)
N31A	S24A	S24A	S24A		S24A
S181A	S146A	S146A			S146A
R241K	R206K	R206K	R206K	R206K	R206K
T251V	T216V	T216V	T216V		T216V
Y266F	Y231F	Y231F			Y231F
S299T			S264T	S264T	S264T
V308L	V273L	V273L	V273L	V273L	V273L
V334L			V299L	V299L	V299L
I338V		I303V		I303V	I303V
C390S	C355S	C355S	C355S	C355S	C355S
L399V	L364V	L364V	L364V	L364V	L364V
V436R				I401R	I401R
I475M	I440M	I440M	I440M		I440M
F514S	I479S		I479S	I479S	I479S
L518V	L483V	L483V	L483V		L483V

1. Algumas substituições observadas em genes DGAT de avelã inovadores CA-DGAT1-J16, CA-DGAT1-J24, CA-DGAT1-J32 ou CA-DGAT1-J37; SEQ ID N° 138, 142, 144 e 148, respectivamente;

2. SEQ ID N° 193 incorpora todas as alterações de GM-DGAT1-J16, GM-DGAT1-J24, GM-DGAT1-J32 e GM-DGAT1-J37; SEQ ID N° 185, 187, 189 e 191, respectivamente.

EXEMPLO 15**ANÁLISE DO TEOR DE ÓLEO DA SEMENTE****ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (NMR)**

[0258] As sementes são inibidas em água destilada por doze a 24 horas a 4 °C. O embrião é dissecado e armazenado em um placa com 48 cavidades. As amostras são liofilizadas por uma noite em um liofilizador Virtis 24x48. O NMR (Process Control Technologies – PCT, Fort Collins, CO) é configurado de acordo com as instruções do fabricante. O NMR é calibrado utilizando uma série de tubos de NMR de 5 mm que contêm quantidades precisamente medidas de óleo de milho (Mazola). Os padrões de calibragem são 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 27, 33 e 40 mg de óleo.

EXEMPLO 16**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE SEMENTES DE SOJA**

[0259] O presente exemplo descreve medições de parâmetros de composição de sementes tais como o teor de proteína e o teor de carboidratos solúveis de sementes de soja derivadas de eventos transgênicos que expressem genes DGAT.

[0260] São medidas as alterações da composição de sementes de soja associadas à expressão de genes DGAT. Com este propósito, as concentrações de proteína, carboidratos solúveis e amido são medidas conforme segue.

ANÁLISE NÃO ESTRUTURAL DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS

[0261] Sementes de soja secas são moídas em um pó fino em um Moedor Geno e subamostras são pesadas (com precisão de 0,1 mg) em treze tubos de vidro de 100 mm; os tubos possuem tampas de rosca forradas com Teflon®. São preparadas três réplicas para cada amostra testada. Os pesos secos de tecido são calculados pesando-se as subamostras antes e depois da secagem em um forno a ar forçado por dezoito horas a 105 °C.

[0262] A extração de lipídios é realizada por meio da adição de parcelas de 2 ml de heptano a cada tubo. Os tubos são misturados por turbilhonamento e colocados em um banho ultrassônico (VWR Scientific Modelo 750D) cheio de água aquecida a 60 °C. As amostras são sonicadas a toda potência (cerca de 360 W) por quinze minutos e centrifugadas em seguida (5 min x 1700 g). Os sobrenadantes são transferidos para treze tubos de vidro de 100 mm limpos e as pelotas são extraídas por mais duas vezes com heptano (2 ml, segunda extração, 1 ml terceira extração) com reunião dos sobrenadantes de cada extração. Após a extração de lipídios, adiciona-se 1 ml de acetona às pelotas e, após mistura por turbilhonamento para dispersar completamente o material, eles são levados para secar em um Speedvac.

EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE CARBOIDRATO NÃO ESTRUTURAL

[0263] Dois mililitros de etanol a 80% são adicionados de cima às pelotas secas. As amostras são misturadas por meio de turbilhonamento vigoroso até que todo o material vegetal seja disperso no solvente antes da sonicação a 60 °C por quinze minutos. Após centrifugação, 5 min x 1700 g, os sobrenadantes são decantados em treze tubos de vidro de 100 mm limpos. São realizadas mais duas extrações com etanol a 80% e os sobrenadantes de cada uma são reunidos. As pelotas extraídas são suspensas em acetona e secas (conforme acima). Uma solução estoque interna de fenil glucopiranosida (100 µl de uma solução estoque de 0,5000 +/- 0,0010 g/100 ml) é adicionado a cada extrato antes da secagem em um Speedvac. Os extratos são mantidos em um dissecador até análise adicional.

[0264] Os pós secos com acetona acima são suspensos em 0,9 ml de tampão MOPS (ácido 3-N[morfolino]propanossulfônico; 50 mM, 5 mM de CaCl₂, pH 7,0) contendo 100 U de α-amilase estável no aquecimento (de *Bacillus licheniformis*; Sigma A-4551). Amostras são colocadas em um bloco de aquecimento (90 °C) por 75 minutos e misturadas por turbilhonamento a cada

quinze minutos. As amostras são mantidas em seguida em resfriamento à temperatura ambiente e adiciona-se 0,6 ml de tampão de acetato (285 mM, pH 4,5) contendo 5 U de amiloglucosidase (Roche 110 202 367 001) a cada uma delas. As amostras são incubadas por quinze a dezoito horas a 55 °C em um banho de água equipado com um agitador recíproco; padrões de amido de batata solúvel (Sigma S-263) são incluídos para garantir que a digestão do amido ocorra até o final.

[0265] Após a digestão, os carboidratos liberados são extraídos antes da análise. Adiciona-se etanol absoluto (6 ml) a cada tubo e, após mistura por turbilhonamento, as amostras são sonicadas por quinze minutos a 60 °C. As amostras são centrifugadas (5 min x 1700 g) e os sobrenadantes são decantados em treze tubos de vidro de 100 mm limpos. As pelotas são extraídas por mais duas vezes com 3 ml de etanol a 80% e os sobrenadantes resultantes são reunidos. Adiciona-se solução estoque interna (100 µl de β-fenil glucopiranosida, conforme acima) a cada amostra antes da secagem em um Speedvac.

PREPARAÇÃO E ANÁLISE DE AMOSTRAS

[0266] As amostras secas das extrações de solúveis e amido descritas acima são solubilizadas em piridina anidra (Sigma-Aldrich P57506) contendo 30 mg/ml de hidroxilamina HCl (Sigma-Aldrich 159417). As amostras são colocadas sobre um agitador orbital (300 rpm) por uma noite e aquecidas em seguida por uma hora (75 °C) com vigorosa mistura por turbilhonamento aplicada a cada quinze minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, são adicionados 1 ml de hexametildissilazano (Sigma-Aldrich H-4875) e 100 µl de ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich T-6508). As amostras são misturadas por meio de turbilhonamento e os precipitados são mantidos em deposição antes da transferência dos sobrenadantes para ampolas de amostras de GC.

[0267] As amostras são analisadas em um cromatógrafo a gás

Agilent 6890 equipado com uma coluna capilar DB-17MS (15 m x 0,32 mm x 0,25 µm de filme). As temperaturas de entrada e do detector são ambas de 275 °C. Após a injeção (2 µl, divisão 20:1), a temperatura da coluna inicial (150 °C) aumenta para 180 °C em uma velocidade de 3 °C/min e, em seguida, a 25 °C/min até uma temperatura final de 320 °C. A temperatura final é mantida por dez minutos. O gás veículo é H₂ em uma velocidade linear de 51 cm/seg. A detecção ocorre por meio de ionização de chama. Análise de dados é realizada utilizando software Agilent ChemStation. Cada açúcar é quantificado com relação ao solução estoque interna e as respostas do detector são aplicadas para cada carboidrato individual (calculadas a partir de conduções padrão com cada conjunto de amostras). As concentrações finais de carboidrato são expressas com base em peso seco de tecido.

ANÁLISE DE PROTEÍNAS

[0268] Os teores de proteína são estimados por meio de análise de combustão em um analisador de combustão Thermo Finnigan Flash 1112EA. Amostras de 4 a 8 mg, pesadas com precisão de 0,001 mg em uma microbalança Mettler-Toledo MX5, são utilizadas para análise. Os teores de proteína são calculados multiplicando-se %N, determinado pelo analisador, por 6,25. Os teores finais de proteína são expressos com base em percentual em peso seco de tecido.

EXEMPLO 17

[0269] Análise de frações de lipídio de sementes transgênicas e embriões somáticos que expressam genes DGAT.

EXTRAÇÃO TOTAL DE LIPÍDIOS

[0270] Todo o lipídio é extraído de cada evento por meio do método de Bligh, E. G. e Dyer, W. J. (*Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917 (1959)) com algumas modificações. Resumidamente, cerca de 100 mg de tecido moído de cada evento são adicionados a um tubo de ensaio com

dimensões de 16 mm x 125 mm com uma tampa de rosca forrada com teflon. Adiciona-se uma mistura de metanol e clorofórmio/2:1 (6 ml) e a amostra é extraída com suave mistura por uma hora, após o quê são adicionados 2 ml de clorofórmio, seguidos por mistura contínua por trinta minutos. Em seguida, adiciona-se 3,6 ml de água, o tubo é turbilhonado vigorosamente e as fases são separadas por meio de centrifugação em uma centrífuga clínica. A camada orgânica inferior é suavemente removida para um segundo tubo de ensaio de vidro e as camadas aquosas superiores são novamente extraídas com 2 ml de clorofórmio. A centrifugação é repetida e a fase orgânica inferior é combinada com a primeira fase orgânica. As amostras são secas sob fluxo de nitrogênio a 50 °C, o total de lipídio é estimado por meio de pesagem e o lipídio é dissolvido em clorofórmio e metanol 6:1 até uma concentração de cerca de 10 mg/ml. É conduzida análise FAME sobre cerca de 50 µg de cada amostra, utilizando o procedimento de ácido sulfúrico e metanol descrito no presente (Exemplo 4) e os resultados são exibidos na Tabela 30.

SEPARAÇÃO DE LIPÍDIOS NEUTROS E POLARES

[0271] Colunas de extração de fase sólida de aminopropila Sep-pak (Waters; colunas de 6 cc, WAT054560) são equilibradas com 5 ml de metanol, seguidos por 5 ml de metanol e clorofórmio 1:1, seguidos por 5 ml de clorofórmio. Cerca de 5 mg de lipídio total em clorofórmio e metanol 6:1 são adicionados a cada coluna, seguidos por cinco parcelas de 1 ml de clorofórmio para eluir os lipídios neutros e todas as frações são recolhidas, combinadas e secas sob um fluxo de nitrogênio a 50 °C.

[0272] Lipídios polares são eluídos em seguida de cada coluna utilizando cinco parcelas de 1 ml de metanol e clorofórmio 1:1, seguidas por cinco parcelas de 1 ml de metanol, e todas as frações são combinadas e secas sob nitrogênio. Lipídios neutros são dissolvidos em cerca de 1 ml de CHCl_3 :MeOH 6:1 e lipídios polares são dissolvidos em cerca de 50 µg de lipídio

neutro, utilizando o procedimento de ácido sulfúrico e metanol descrito no presente (Exemplo 4).

SEPARAÇÃO DE TAG, PC E PE POR MEIO DE TLC

[0273] Cerca de 100 µl de extrato de lipídio neutro são carregados a 2 cm do fundo de uma placa TLC Partisil K6 Sílica Gel 60 A (Whatman, espessura de 250 µm, 20 cm x 20 cm). De forma similar, cerca de 200 µl da fração de lipídio polar são carregados sobre a mesma placa de TLC. Soluções estoque (10 mg/ml em clorofórmio:metanol 6:1) de TAG, PC e PE também são manchadas sobre as placas. Placas de TLC são desenvolvidas em CHCl₃:MeOH:AcOH 65:35:8 até que a frente de solvente esteja a cerca de metade do caminho até a placa. As placas de TLC são secas em ar em seguida por dez minutos e completamente desenvolvidas em 70:30:1 (v/v/v) hexano: dietil éter: ácido acético. Os padrões são visualizados por meio de manchas de luz com vapor de iodo e faixas correspondentes para TAG, PC e PE são cortadas da placa de TLC. Sílica gel contendo cada espécie de lipídio é derivada diretamente com ácido sulfúrico e metanol conforme descrito no presente (Exemplo 4) e os resultados são exibidos na Tabela 30.

ANÁLISE DE POSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE TAG

[0274] Os perfis de ácidos graxos da posição sn2 de TAG são determinados utilizando lipase pancreática de suínos para remover os grupos acila da posição sn1 e sn3 apenas de TAG, seguidos por transesterificação do monoacilglicéride (MAG) resultante produzido. Cerca de 5 mg de extrato de lipídio neutro são suspensos em 2 ml de 1 M Tris HCl, pH 8,0, junto com 0,2 ml de cloreto de cálcio a 2,2% e 0,5 ml de sais de bile a 0,05% em um tubo de ensaio com tampa de rosca de vidro. O lipídio é incubado a 37 °C por cinco minutos são adicionados diretamente 5 mg de lipase pancreática de suínos e a suspensão é incubada com agitação a 37 °C por vinte minutos. Após a incubação, a reação é encerrada com a adição de 1 ml de etanol seguida por 1

ml de 6 M HCl. Após mistura, são adicionados 2,5 ml de dietil éter, as fases são separadas por meio de centrifugação e a camada orgânica superior é removida cuidadosamente. A extração com dietil éter é repetida e a fase superior de dietil éter é combinada com a primeira. Após secagem sobre sulfato de sódio anidro, o dietil éter é evaporado sob fluxo de nitrogênio a 50 °C e o lipídio resultante é dissolvido em 200 µl de clorofórmio: metanol 6:1. O lipídio é carregado sobre uma placa de TLC Partisil K6 junto com padrões de triacilglicéride (TAG), diacilglicéride (DAG), monoacilglicéride (MAG) e ácido graxo livre (FFA) e a placa de TLC é desenvolvida conforme descrito no presente. Em seguida, são visualizados padrões com leve mancha de iodo e a faixa de MAG é cortada e derivada com metanol e ácido sulfúrico, conforme descrito anteriormente no presente. O percentual de ácido graxo total para cada ácido graxo (ou seja, 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3) nas posições sn1 e sn3 de TAG é calculado com a fórmula a seguir:
$$= ([TAG_x] - [sn2_x]/3) * 3/2;$$
 em que x indica o ácido graxo de interesse.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE AUMENTO DO TEOR TOTAL DE ÁCIDO GRAXO DE UMA CÉLULA DE OLEAGINOSA, caracterizado por compreender:

(a) obtenção de um ácido nucleico que compreende SEQ ID NO: 160;

(b) transformação de pelo menos uma célula de oleaginosa com o ácido nucleico recombinante da etapa (a); e

(c) seleção da(s) célula(s) de oleaginosa transformada(s) da etapa (b) que contém(êm) um teor total de ácido graxo aumentado em comparação com o teor total de ácido graxo de uma célula de oleaginosa segregante nula.

2. ÁCIDO NUCLEICO RECOMBINANTE, caracterizado por compreender SEQ ID NO: 160.

3. CONSTRUÇÃO DE DNA RECOMBINANTE, caracterizada por compreender o ácido nucleico recombinante, conforme definido na reivindicação 2, ligado operativamente a pelo menos uma sequência reguladora.

4. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UMA SEMENTE OLEAGINOSA, que possui um aumento no teor total de ácido graxo, caracterizado pelo mencionado método compreender:

(a) fornecer uma semente oleaginosa transgênica, em que a mencionada semente oleaginosa transgênica compreende a mencionada construção de DNA recombinante, conforme definida na reivindicação 3, e em que a mencionada semente transgênica possui um teor total de ácido graxo aumentado em comparação ao teor total de ácido graxo de uma oleaginosa, segregante nula, não transgênica;

(b) cultivar a mencionada semente oleaginosa transgênica para regenerar uma planta oleaginosa transgênica; e

(c) obter uma semente oleaginosa a partir da mencionada planta oleaginosa transgênica regenerada, em que a mencionada semente oleaginosa possui um teor total de ácido graxo aumentado em comparação ao teor total de ácido graxo de uma oleaginosa, segregante nula, não transgênica.

5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pela oleaginosa ser selecionada a partir do grupo que consiste em soja, milho, canola, girassol, linho, algodão e cártamo.

6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pela oleaginosa ser soja.

7. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, caracterizado por compreender ainda a etapa de utilizar a mencionada semente oleaginosa para produzir um produto e/ou um subproduto.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo mencionado produto ser alimento ou ração.

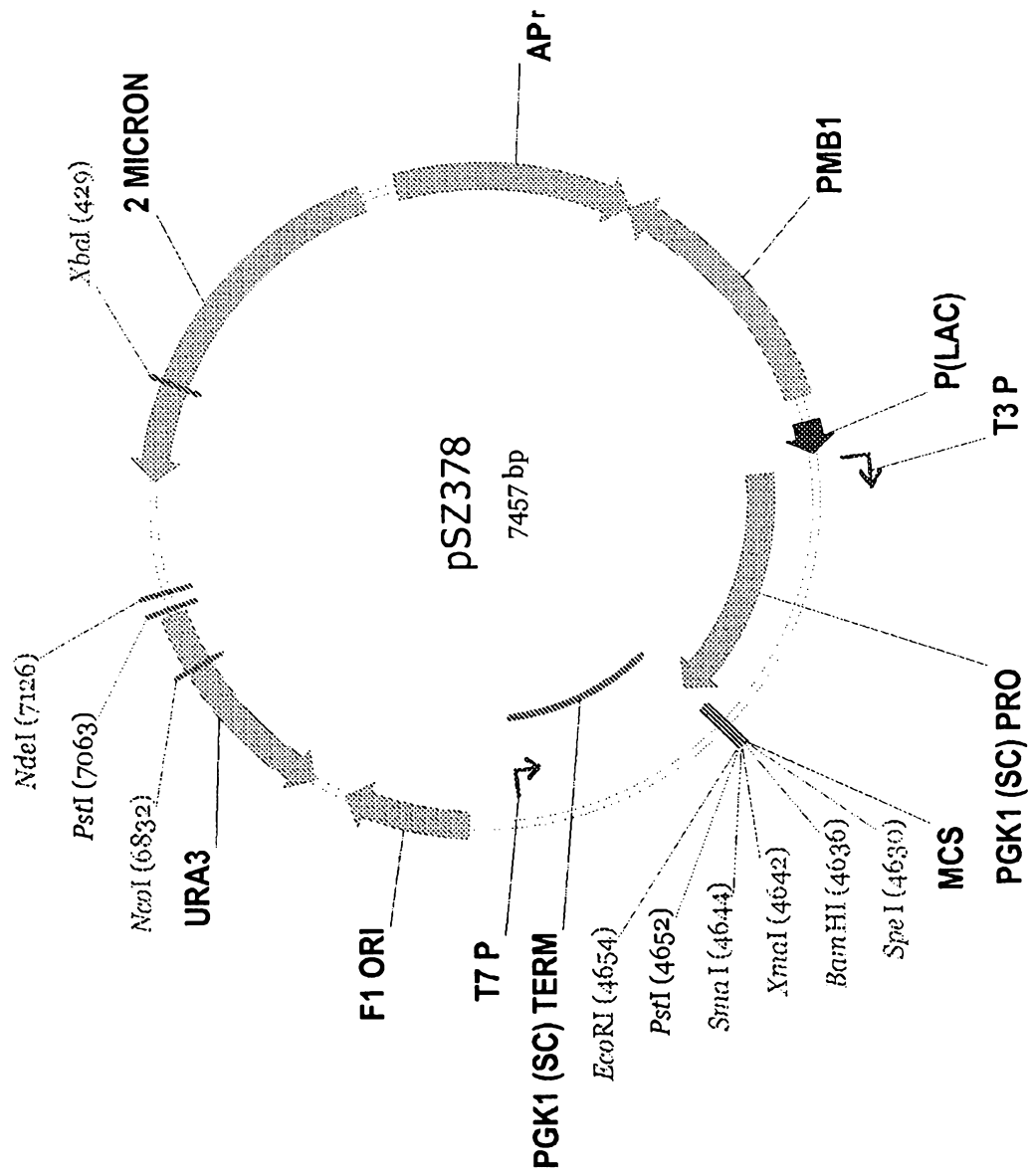


Fig. 1

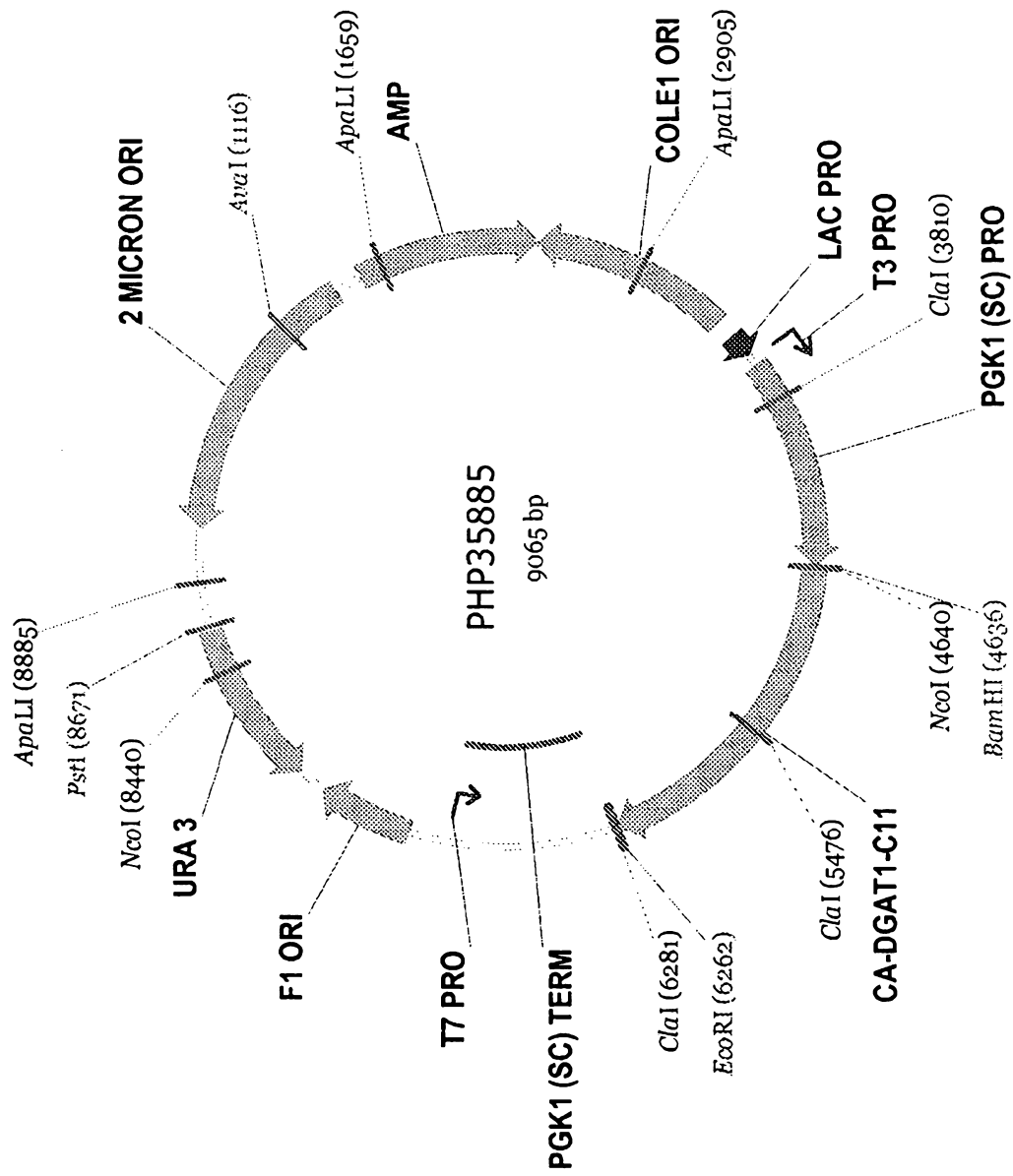
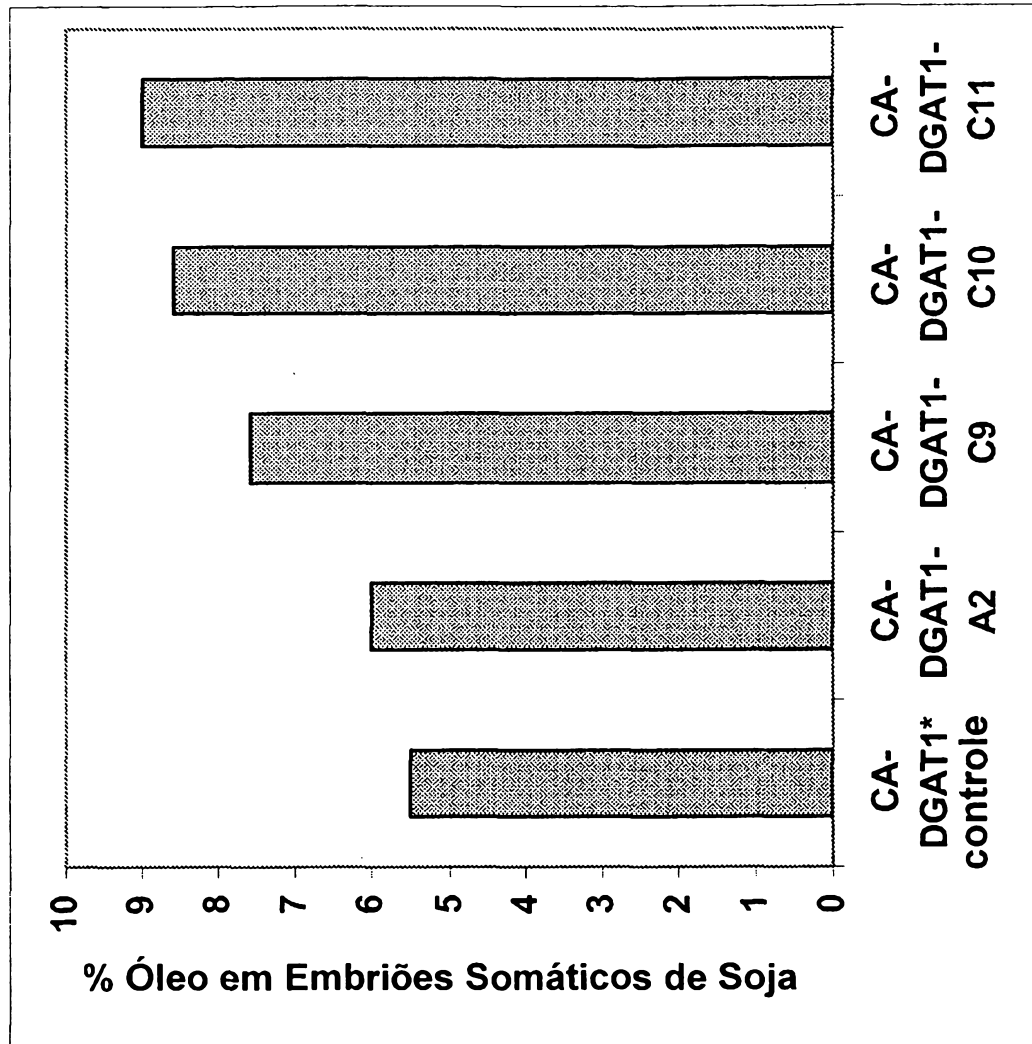


Fig. 2

*Fig. 3*

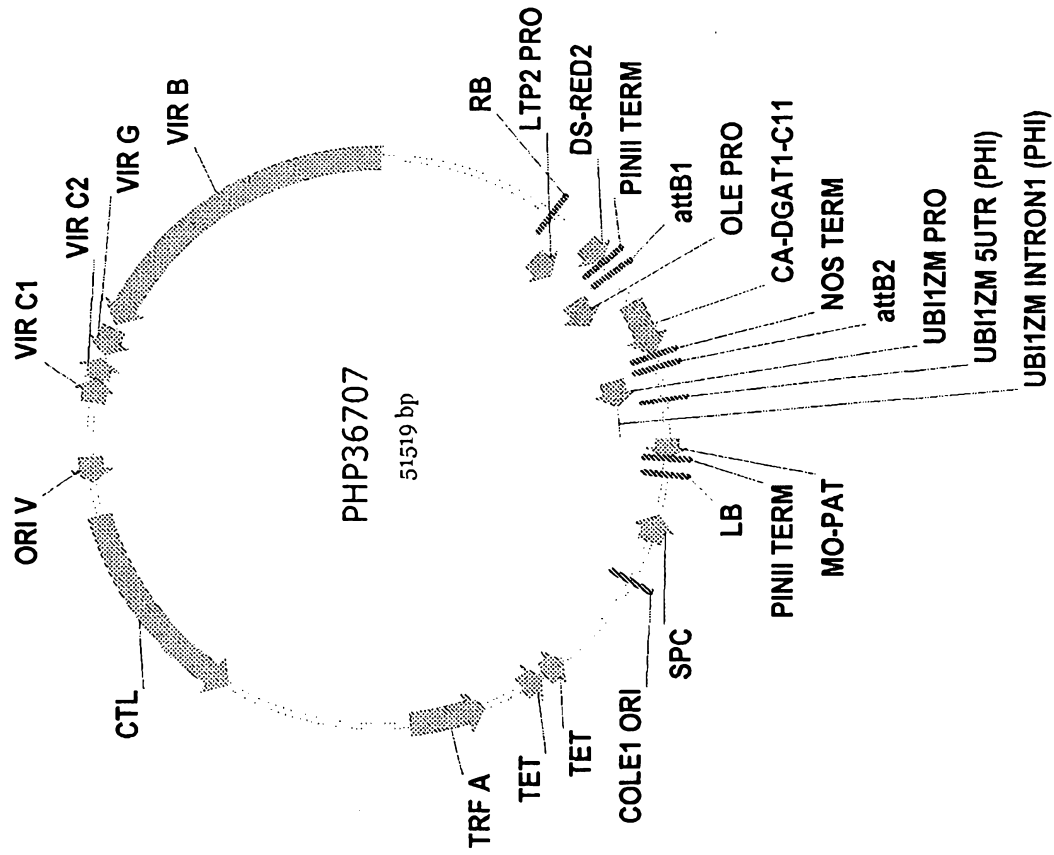


Fig. 4

Maioria	MAISDS	PESVADA	LDSLRLRRRPSAS	SSAG-LF	DSPS-TTTTSGADAKXRDSGS	DCXKN	SD	--V-
SEQIDNO: 12	MAISDM	PESTGATTA	TMPHGGLRRRENAT	ETTE-VS	DSNS-KTTDPDSCNVSRESVRDRSDSTDLSARKSOEDDGSRSEVIESANPV			--AV
SEQIDNO: 153	MAISDE	PESVADA	LNHSLRLRRPSAT	STAG-LF	NSPE-TTTDSGDDLKDSGS	DDSN	SODA	--AV
SEQIDNO: 195	MAISDE	PESVADA	LNHSLRLRRPSAT	STAG-LF	NSPE-TTTDSGDDLKDSGS	DDSN	NDA	--AV
SEQIDNO: 16	MAISDE	PESVADA	LNHSLRLRRPSAT	STAG-LF	NSPE-TTTDSGDDLKDSGS	DDSN	SODA	--AA
SEQIDNO: 196	MAISDE	PETVATA	LNHSLRLRRP	TAAG-LF	NSPE-TTTDSGDDLKDSGS	DDSTS	SD	--AA
SEQIDNO: 197	MAISDE	PETVATA	LNHSLRLRRP	TAAG-LF	NSPE-TTTDSGDDLKDSGS	DDSTS	SD	--AA
SEQIDNO: 198	MAISDE	PESVADA	LNHSLRLRRPSAT	STAG-LF	NSPE-TTTDSGDDLKDSGS	DDSN	SODA	--AA
SEQIDNO: 199	MAPPPMP	A-ASDRACGRDAG	DSSLRLRRAPS	ADAGDLAG	DSSV-GLRNG	TNRPP		--V-
SEQIDNO: 200	MAILDS	AGVTVPENGGE	FVDLRLRRKRS	DSSNGLLS	GSDNNSPSDVGAPADVDRIDSVVN	DDAQTANLAGDNG		--G
SEQIDNO: 201	MAICNS	PVSVTTPSSSS	HADSILDFIRKEGG	KKA-VA	DSSL-ETETAANAVALVE	AERSYGEVSGGDGSGSQVV		--V
SEQIDNO: 202	MAICNS	PVSVTTPSSSS	HADSILDFIRKEGG	KKA-VA	DSSL-ETETAANAVALVE	AERSV		--V
SEQIDNO: 203	MALDT	PQIGELT-T	TATTIRRHPIGK	PDAG-IG	DGLF-SSSSKRTNSSFEGDS	LNGDNDFKRQIG		--AG
SEQIDNO: 204	MALDT	PQIGELT-T	TATTIRRHPIVK	PDAG-IG	DGLFDSSSKRTNSSFEGDS	LNGDNDFKRQIG		--AG
SEQIDNO: 205	MTPETPNKSTDATSGAES-SS		DLNLSLRRRRIAS	NSDGAVA	ELAS-KIDELESDAQGGAVIKDPCA-ENDSGTLKNG	KDCG		--TV
SEQIDNO: 206	MAVAES	SQNTTMSGHGD	SDINNFRRKSSS	VIEPSSSGFTG	TNGV-PAT-GHVAENRDQRVGAM	ENATGSYNLIINGGG		--V
SEQIDNO: 207						XNVEDIUNSG	RBC	
SEQIDNO: 208	MAILDS	PEILDTPSSAONG	AAHTLRRPSARSVPPLDSDSNSLEAESAINDSN	VRNDAMLLENRGGAWE	SENEXEYSYE			--EG
SEQIDNO: 209	MVSGDG	DGSGGCEAHAP?	AAPAHHRRPRP	RGSSGAIVEG	FAAALERRRISGAAAARASFCS	DSGDEANASGPSSSSSSSFRRRG		
SEQIDNO: 210	MAPPPSL	APDRGGCPED	AILRLRAAA	AAAG	DAP	AEQQ		
SEQIDNO: 211	MVSGDG	DGSGGCEAHAP?	AAPAHHRRPRP	RGSSGAIVEG	FAAALERRRISGAAAARASFCS	DSGDEANASGPSSSSSSSFRRRG		
SEQIDNO: 212	MTPEL	PESLETITLNGHS	RAASTVRRRSDIV	AVLEDNSULEA	VNDSOS-DVNNINMGNLRGVME	SALDESELGTGLR		--NG
SEQIDNO: 213	MAISDT	PETTATATATVIETOTDKRSSILRRRPSAT		STAGGLE	D	AESAADAVEDSGS		--EV
SEQIDNO: 214	MAISED	SESLFAAANAASS	VIQSGSSVRRRPSAI	SAVATVE	DE	SSBEEVPVEDSGSD		--VS
SEQIDNO: 215	MTILET	TT-SGEGVAES-SS	DLNVSLRRRRT	SSUGALP	ELTS-NIVELESFG-QVMNDPCM	VTEPETERKING	KCG	--GD
SEQIDNO: 216		MANLINE-AS	DLNFLRRRTEG	ISSITTVP	DSSS-ETSSEANDLD-GCKGAARD-VKDRGDJAVEFF	DNOM	KN	
SEQIDNO: 217	MEILDS	GGVTMPENG	ADLOTLRHRKRS	DSSNGLLP	DSVT-VSD	ADVRDVDSAV	EDTOGKANLAGENBI	--R
SEQIDNO: 218	MAILDS	GGVAVPPRENG	VADLRLHRRKRS	DSSNGLLS	DTS-PSDDVGAAAERDRVDSAAE	EEOQGTANLAGCDAE		--T
SEQIDNO: 219	MAILDS	AGVTVPENGGE	FVDLRLRRKRS	DSSNGLLS	GSDNNSPSDVGAPADVDRIDSVVN	DDAQTANLAGDNG		--G
SEQIDNO: 220	MAPPPMP	A-ASDRACGRDAG	DSSLRLRRAPS	ADAGDLAG	DSSG-GLRNG	EPQSP		--V-
SEQIDNO: 221	MAILDS	GGVAVPPRENG	VADLRLHRRKRS	DSSNGLLS	DTS-PSDDVGAAAERDRVDSAAE	EEOQGTANLAGCDAE		--T
SEQIDNO: 222								

Maio	NEQXQN	---EN	---TD	---VKFYRPSVPAHRR	---KESPLSSDAI	---EKQSHAGLFNLCI	---VAVN	---SRLI
Maio	TNGNDG	---GKLIANGEDRR	---DFAA	---VKLANRPSVPAHRR	---KESPLSSDAI	---EKQSHAGLFNLCI	---VAVN	---SRLI
Maio	SSSEQIDNO:12	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:153	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:195	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:16	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:196	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:197	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:198	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:199	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:200	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:201	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:202	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:203	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:204	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:205	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:206	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:207	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:208	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:209	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:210	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:211	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:212	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:213	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:214	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:215	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:216	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:217	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:218	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:219	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:220	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:221	---	---	---	---	---	---	---
Maio	SSSEQIDNO:222	---	---	---	---	---	---	---

Fig. 5D

Maoria	GEALP	DTLNM	-YSYDV	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	PCIRKGMVXRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 12	GDVLP	SLNTE	-YPSVS	FKSLAYFM	MAPLCYQTSYPRTP	ACIRKSMVVRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 153	GEALL	DTLNM	-YPYVS	FKSLAYFL	MAPLCYQPSYPRTP	PIRKGMVPRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 195	GEALL	DTLNM	-YPYVTE	FKSLAYFL	MAPLCYQPSYPRTP	PIRKGMVPRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 16	GEALL	DTLNM	-YPYVSE	FKSLAYFI	MAPLCYQPSYPRTP	PIRKGMVPRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 196	GEALP	DTLNM	-YPYVSE	FKSLAYFL	MAPLCYQPSYPRTP	PIRKGMVPRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 197	GEALP	DTLNM	-YPYVSE	FKSLAYFL	MAPLCYQPSYPRTP	PIRKGMVPRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 198	GEALL	DTLNM	-YPYVSE	FKSLAYFL	MAPLCYQPSYPRTP	PIRKGMVPRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 199	GAAYG	NYVDF	-NMKDP	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	PIRKGMVPRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 200	--ANP	----	-VSYYV	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	ACIRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 201	GDDLST	SLNME	-YPYDVN	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	SCIRKGMVPRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 202	GDDLST	SLNME	-YPYDVN	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	SCIRKGMVPRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 203	GEVEFM	SSNME	-YFYDIN	FKSLAYFM	MAPLCYQISYPRTP	AFIRKGMVPRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 204	GEVEFM	SSNME	-YFYDIN	FKSLAYFM	MAPLCYQISYPRTP	AFIRKGMVPRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 205	GDALN	MASSAB	-GSHDV	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	ASIRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 206	GDALN	MASSAB	-GSHDV	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	ASIRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 207	EDVPS	ISPYE	-NPDYD	FKSLAYFM	MAPLCYQSSYPRTP	ESVRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 208	WEAMR	RYWNLE	-YAYDV	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	ACIRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	LMGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 209	VONEL	STVME	-NLQPP	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	SCVRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	LMGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 210	VONEL	STVME	-NLQPP	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	SCVRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	LMGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 211	VONEL	STVME	-NLQPP	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	SCVRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	LMGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 212	GETLS	GYWNS	-DSYGAS	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	SCVRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 213	GERNPD	TFNME	-EYPHNV	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	SCVRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 214	GEALP	DTLNM	-YSYDV	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	SCVRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 215	GDALN	MASSAB	-ESRDV	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	SCVRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 216	GDTP	LSQNM	-YSFDV	FKSLAYFM	MAPLCYQISYPRTP	PIRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	LMGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 217	--ANP	----	-VSYYV	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	SCVRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 218	--VDF	----	-USYYV	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	SCVRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 219	--ANP	----	-USYYV	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	SCVRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 220	GAAYG	NYVDF	-NMKDP	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	SCVRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 221	--VDF	----	-USYYV	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	SCVRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE
SEQIDNO: 222	--ANP	----	-VSYYV	FKSLAYFM	MAPLCYQPSYPRTP	SCVRKGMVVRQ	LKUIIFT	FTG	MGFI	IEQYINPIV	NSQHP	GNLLY	AIER	VKL	SVN	LYVWL	CMFY	FFH	WLNI	DAE

[illegible]

Fig. 5F

Maoria MCVLLYYHDEIMNR-KGKXX---
SEQIDNO:12 MCVLLYYHDEIMNR-KGKTE 540
SEQIDNO:153 MCVLLYYHDEIMNR-KGKLD 504
SEQIDNO:195 MCVLLYYHDEIMNR-KGKLD 504
SEQIDNO:16 MCVLLYYHDEIMNR-KGKLD 504
SEQIDNO:196 MCVLLYYHDEIMNR-KGKLD 498
SEQIDNO:197 MCVLLYYHDEIMNR-KGKLD 498
SEQIDNO:198 MCVLLYYHDEIMNR-KGKLD 504
SEQIDNO:199 MCVLLYYHDEIMNR-QAQASR 494
SEQIDNO:200 MCVLLYYHDEIMNR-KGSMS 547
SEQIDNO:201 MCVLLYYHDEIMNR-KETTESL 518
SEQIDNO:202 MCVLLYYHDEIMNR-KETTXSSL 502
SEQIDNO:203 MCVFLYYHEIMN-Q-KGKSK 517
SEQIDNO:204 MCVLLYYHDEIMNQ-KGKSK 523
SEQIDNO:205 MCVLLYYHDEIMNR-KGTTESR 526
SEQIDNO:206 MCVLLYYHDEIMNL-KEK 518
SEQIDNO:207 MCVLLYYHDEIMNR-K 446
SEQIDNO:208 MCVLLYYHDEIMNR-KASAR 534
SEQIDNO:209 MCVLLYYHDEIMNR-IEKAR 538
SEQIDNO:210 MCVLLYYHDEIMNRQQAQTNR 477
SEQIDNO:211 MCVLLYYHDEIMNR-IEKAR 504
SEQIDNO:212 MCVLLYYHDEIMNR-KASAK 532
SEQIDNO:213 MCVLLYYHDEIMNR-KGEID 539
SEQIDNO:214 MAVLLYYHDEIMNR-KSKLDQS 511
SEQIDNO:215 MCVLLYYHDEIMNR-KGNAELR 521
SEQIDNO:216 MCVLLYYHDEIMNR-NGKME 507
SEQIDNO:217 MCVLLYYHDEIMNR-KGKMS 501
SEQIDNO:218 MCVLLYYHDEIMNR-KGSMS 503
SEQIDNO:219 MCVLLYYHDEIMNR-KGSMS 520
SEQIDNO:220 MCVLLYYHDEIMNR-QAQASR 494
SEQIDNO:221 MCVLLYYHDEIMNR-KGSMS 503
SEQIDNO:222 MCVLLYYHDEIMNR-KGSMS 341

Fig. 6

