

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

(21) **PI0708748-9 A2**

(22) Data de Depósito: 09/03/2007
(43) Data da Publicação: 28/06/2011
(RPI 2112)



(51) Int.Cl.:

A01H 1/00 2006.01
A01H 5/00 2006.01
C12N 15/82 2006.01
C12N 15/87 2006.01
C12N 5/04 2006.01
C12N 5/00 2006.01
C12N 5/02 2006.01
C12N 15/00 2006.01
C12P 21/06 2006.01

(54) Título: **COMPOSIÇÕES DE ÓLEO E SEMENTE DE SOJA E MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DAS MESMAS**

(30) Prioridade Unionista: 10/03/2006 US 60/781,519

(73) Titular(es): Monsanto technology LLC

(72) Inventor(es): Greg. E. Keithly, Joanne J. Fillatti, Tim Ulmasov, Toni Voelker

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemens, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007063643 de 09/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/106728 de 20/09/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES DE ÓLEO E SEMENTE DE SOJA E MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DAS MESMAS. A presente invenção refere-se a métodos para obter plantas de soja que produzem semente com baixos níveis de ácido linolênico e níveis oléicos moderadamente aumentados. A invenção também refere-se a métodos para produzir semente com baixos níveis de ácido linolênico, níveis oléicos moderadamente aumentados e baixos níveis de ácido graxo saturado. Estes métodos vinculam a combinação de transgenes que fornecem níveis moderados de ácido oléico com idioplasma de soja que contém mutações em genes de soja que conferem baixos fenótipos de ácido linolênico. Estes métodos também vinculam a combinação de transgenes que fornecem tanto moderados níveis de ácido oléico quanto baixos níveis de gordura saturada com idioplasma de soja que contém mutações em genes de soja que conferem baixos fenótipos de ácido linolênico. A invenção também refere-se a plantas de soja e sementes produzidas por estes métodos são também descritas.

Pet m² 020080141744 / RJ
(13/11/08)
PSO 708748-9

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"COMPOSIÇÕES DE ÓLEO E SEMENTE DE SOJA E MÉTODOS DE
PREPARAÇÃO DAS MESMAS".**

Referência Cruzada aos Pedidos Relacionados

- 5 Este pedido reivindica prioridade para a data de depósito de 10 de março, de 2006 do Pedido de Patente Provisório U.S. Número 60/781.519 que está aqui incorporado por referência em sua totalidade.

Declaração com Respeito ao Desenvolvimento ou Pesquisa Federalmente Patrocinada

- 10 Não Aplicável.

Apêndice

Não Aplicável.

Incorporação da Listagem de Seqüência

- 15 Uma cópia de documento da Listagem de Seqüência e uma forma legível por computador da listagem de seqüência em disquete, contendo o arquivo chamado "38-77(54449) SEQ LIST" que é 71 278 bytes em tamanho (medido em MS-DOS), estão aqui incorporados por referência. Esta Listagem de Seqüência consiste em SEQ ID NOs:1-63.

Antecedentes Da Invenção

- 20 1. Campo da Invenção

Esta invenção geralmente se refere aos métodos para fabricação de plantas de soja que produzem semente de soja com composições de óleo alteradas e, mais particularmente, aos métodos onde a semente de soja com uma semente de soja ou fenótipo pouco linolênico, 25 meio oléico com um fenótipo pouco linolênico, pouco saturado, meio oléico, é produzido.

2. Técnica relacionada

- 30 Os óleos de planta são usados em uma variedade de aplicações. Novas composições de óleo vegetal e abordagens melhoradas são necessárias para obter composições de óleo, de fontes de planta naturais ou biossintéticas. Dependendo do uso de óleo pretendido, várias composições de ácido graxo diferentes são desejadas. As plantas,

especialmente espécies que sintetizam quantidades grandes de óleos em sementes, são uma fonte importante de óleos tanto para uso comestível quanto industrial. Os óleos de semente são quase completamente compostos de triacilgliceróis nos quais os ácidos graxos são esterificados para os três grupos hidroxila de glicerol.

O óleo de soja contém tipicamente cerca de 16-20% de ácidos graxos saturados: 13-16% de palmitato e 3-4% de estearato. Geralmente veja Gunstone e outros, *The Lipid Handbook*, Chapman & Hall, London (1994). Os óleos de soja foram modificados através de vários métodos de reprodução para criar benefícios para os mercados específicos. Entretanto, um óleo de soja que é amplamente benéfico a maioria dos usuários de óleo de soja, tal como consumidores de óleo de salada, óleo de cozinha e óleo de fritura, e mercados industriais, tal como biodiesel e mercados de biolubrificantes, não está disponível. Os óleos de soja anteriores foram ou muito caros ou necessitaram de uma propriedade de qualidade de comida importante tal como estabilidade oxidativa, bom sabor de comida frita ou conteúdo de gordura saturada, ou uma propriedade de biodiesel importante tal como emissões de óxido nítrico apropriadas ou tolerância ao frio ou fluxo frio.

As plantas mais altas sintetizam ácidos graxos por uma série de reações metabólica comum—a série de reação de ácido graxo sintetase (FAS), que fica localizada nos plastídeos. As β -cetoacil-ACP sintases são enzimas de limitação de taxa importantes na FAS de células de planta e existem em várias versões. β -cetoacil-ACP sintase I catalisa alongamento de cadeia para palmitoil-ACP (C16:0), considerando que β -cetoacil-ACP sintase II catalisa alongamento de cadeia para estearoil-ACP (C18:0). β -cetoacil-ACP sintase IV é uma variante de β -cetoacil-ACP sintase II, e também pode catalisar alongamento de cadeia para 18:0-ACP. Em soja, os produtos principais de FAS são 16:0-ACP e 18:0-ACP. A dessaturação de 18:0-ACP para formar 18:1-ACP é catalisada por uma delta-9 dessaturase solúvel localizada em plastídeo (também chamada "estearoil-ACP dessaturase"). Veja Voelker e outros, 52 *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 335-61

(2001).

Os produtos da FAS plastidial e delta-9 dessaturase, 16:0-ACP, 18:0-ACP, e 18:1-ACP, são hidrolisados através de tioesterases específicas (FAT). As tioesterases de planta podem ser classificadas em duas famílias de gene com base em homologia de sequência e preferência de substrato. A primeira família, FATA, inclui acil-ACP tioesterases de cadeia longa que tem atividade principalmente em 18:1-ACP. As enzimas da segunda família, FATB, geralmente utilizam 16:0-ACP (palmitoil-ACP), 18:0-ACP (estearoil-ACP), e 18:1-ACP (oleoil-ACP). Tais tioesterases têm um papel importante na determinação do comprimento de cadeia durante biossíntese de ácido graxo de novo em plantas, e deste modo estas enzimas são úteis na provisão de várias modificações de composições de acila graxa, particularmente com respeito às proporções relativas de vários grupos acila graxa que estão presentes em óleos de armazenamento de semente.

Os produtos das reações de FATA e FATB, os ácidos graxos livres, deixam os plastídeos e são convertidos para seus respectivos ésteres de acil-CoA. Acil-CoAs são substratos para a série de reações de biossíntese de lipídio (Série de Reação de Kennedy), que fica situada no retículo endoplasmático (ER). Esta série de reação é responsável pela formação de lipídio de membrana como também pela biossíntese de triacilgliceróis que constitui o óleo de semente. No ER há dessaturases adicionais ligadas à membrana, que podem também dessaturar 18:1 para ácidos graxos poliinsaturado. Uma delta-12 dessaturase (FAD2) catalisa a inserção de uma ligação dupla em 18:1 (ácido oléico), formando ácido linoléico (18:2). Uma delta-15 dessaturase (FAD3) catalisa a inserção de uma ligação dupla em 18:2, formando ácido linolênico (18:3).

A inibição do gene FAD2 endógeno por uso de transgenes que inibem a expressão de FAD2 foi mostrada para conferir um fenótipo de ácido meio oléico desejável (18:1) (isto é, a semente de soja que compreende 50% e 75% de ácido oléico em peso). Os transgenes e as plantas transgênicas que fornecem inibição da expressão de gene FAD2 endógena e um fenótipo meio oléico, são descritos na Patente U.S. 7.067.722. Em contraste, as

plantas de soja tipo silvestre que necessitam de transgenes de inibição de FAD2 tipicamente produzem semente com composições de ácido oléico de menos do que 20%.

O óleo de soja contém tipicamente cerca de 8% de ácido linolênico (18:3) que resulta em estabilidade e sabor reduzidos. Os níveis de ácido linolênico (18:3) em óleo de soja podem ser reduzidos através de hidrogenação para melhorar tanto a estabilidade quanto o sabor (Dutton e outros, 1951; Lui e White, 1992). Infelizmente, a hidrogenação resulta na produção de ácidos graxos trans, que aumentam o risco para doença cardíaca coronária quando consumiu (Hu e outros, 1997).

A reprodução convencional também foi usada para gerar linhagens de soja com os níveis linolênicos que variam de 1%-6% (Ross e outros, Crop Science, 40:383; 2000; Wilson e outros J. Oleo Sci., 50:5, 87, 2001; Wilson Lipid technology Sept. 1999). As variedades de soja de ácido pouco linolênico foram produzidas por mutação, peneiragem e reprodução (Fehr e outros, 1992; Rahman e Takagi, 1997; Ross e outros, 2000; Byrum e outros, 1997; Stoisin e outros, 1998). Certas variedades de soja com um conteúdo de ácido linolênico de cerca de 1% ou mais baixo, foram obtidas (Patentes U.S. nºs 5.534.425 e 5.714.670). Mais recentemente, os métodos para obter plantas de soja com ambos os níveis baixos de níveis de ácido linolênico como também as características de produção e crescimento de variedades de soja agronomicamente elite foram descritos (Pedido de Patente U.S. 2006/0107348).

O ácido oléico tem uma ligação dupla, porém ainda é relativamente estável em temperaturas elevadas, e os óleos com níveis elevados de ácido oléico são adequados para cozimento e outros processos onde o aquecimento seja requerido. Recentemente, o consumo aumentado de óleos oléicos elevados foi recomendado, porque o ácido oléico parece reduzir os níveis de sangue de lipoproteínas de densidade baixa ("LDLs") sem afetar os níveis de lipoproteínas de densidade elevada ("HDLs"). Entretanto, alguma limitação de níveis de ácido oléico é desejável, porque quando ácido oléico é degradado em temperaturas elevadas, ele cria

compostos de sabor negativo e diminui os sabores positivos criados pela oxidação de ácido linoléico. Neff e outros, JAOCS, 77 :1303-1313 (2000); Warner e outros, J. Agric. Food Chem. 49:899-905 (2001). É deste modo preferível usar óleos com níveis de ácido oléico que sejam 65-85% ou menos em peso, para limitar os sabores de má qualidade em aplicações de comida tal como óleo de fritura e comida frita. Outros óleos preferidos têm níveis de ácido oléico que são maiores do que 55% em peso para melhorar a estabilidade oxidativa.

Para muitas aplicações de óleo, os níveis de ácido graxo saturado de menos do que 8% em peso ou até mesmo menos do que cerca de 2-3% em peso são desejáveis. Os ácidos graxos saturados têm pontos de fusão elevados que são indesejáveis em muitas aplicações. Quando usados como uma carga de alimentação ou combustível, os ácidos graxos saturados causam turvação em baixas temperaturas, e conferem propriedades de fluxo frio pobres como pontos de derramamento e pontos de ligação de filtro frio, ao combustível. Os produtos de óleo que contêm níveis baixos de ácido graxo saturado podem ser preferidos pelos consumidores e pela indústria de comida porque eles são percebidos como mais saudáveis e/ou podem ser rotulados como "sem gordura saturada" de acordo com diretrizes de FDA. Além disso, os óleos pouco saturados reduzem ou eliminam a necessidade de trabalhar sob temperaturas hibernais o óleo para aplicações de comida tal como óleos de salada. Em aplicações de biodiesel e lubrificante os óleos com baixos níveis de ácido graxo saturado conferem propriedades melhoradas de fluxo frio e não turvam em baixas temperaturas.

As linhagens de soja que produzem semente com conteúdo de ácido meio oléico, pouco linoléico, seriam muito desejáveis. Infelizmente, as tentativas de combinar as características meio oléicas e pouco linolênicas por abordagens de engenharia genética, foram problemáticas. As linhagens transgênicas onde ambos os genes de delta-12 dessaturase (FAD2) e delta-15 dessaturase (FAD3) foram suprimidos têm sementes com níveis linolênicos baixos, porém os níveis de ácido oléico são tipicamente acima da

faixa definida para meio oléico. Entretanto, os métodos descritos aqui permitem a produção de sementes de soja pouco linolênicas que também têm níveis de ácido oléico na faixa de meio oléico de 55-80%. Além disso, estes métodos não requerem processos de hidrogenação e deste modo evitam a produção de gorduras trans indesejáveis.

As linhagens de soja que produzem semente com conteúdo de ácido meio oléico, pouco saturado, pouco linoléico também seriam muito desejáveis. Os métodos descritos aqui permitem a produção de sementes de soja pouco linolênicas que também têm níveis de ácido oléico na faixa oléica moderada de 55-80% e níveis de ácido graxo saturado de menos do que 8%.

Sumário da Invenção

Devido aos problemas anteriores que a presente invenção foi desenvolvida. A primeira invenção se refere a um método para produzir uma planta de soja que compreende um conteúdo de ácido linolênico de menos do que cerca de 6% de ácidos graxos de semente totais em peso e um conteúdo de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso. Este método da invenção é praticado por uma primeira etapa para a preparação de uma ou mais plantas de soja que compreendem um transgene que diminui a expressão de um gene FAD2-1 de soja endógena e pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena, uma segunda etapa para obter pelo menos uma semente da referida planta de soja obtida da primeira etapa, uma terceira etapa para determinar uma porcentagem do conteúdo de ácido graxo de semente total em peso de ácido linolênico e ácido oléico para a semente da segunda etapa, e então identificando uma planta de soja que produz semente que tem uma composição de ácido graxo de semente que compreende um conteúdo de ácido linolênico de menos do que cerca de 6% de ácidos graxos de semente totais em peso e um conteúdo de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso.

Em outras modalidades deste método, as plantas de soja que

são feitas na primeira etapa compreendem pelo menos duas mutações de perda de função em pelo menos dois genes de FAD3 de soja endógena. Esta perda de mutações de função pode ser localizada nos genes de FAD3-1B e FAD3-1C de soja endógena. Nesta modalidade do método, as plantas

5 de soja identificadas na terceira etapa do método compreendem um conteúdo de ácido linolênico de menos do que cerca de 3% de ácidos graxos de semente totais em peso e um conteúdo de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso.

Em certas modalidades deste método, o transgene pode

10 também compreender um transgene que confere tolerância ao herbicida. O transgene de tolerância ao herbicida pode conferir tolerância ao glifosato. Em modalidades específicas da invenção, o transgene compreende seqüências localizadas entre as seqüências fronteiras de T-DNA de pMON68504, pCGN5469, pCGN5471, ou pCGN5485 que são integradas em

15 um cromossomo da referida planta.

Na terceira etapa do método, a porcentagem do conteúdo de ácido graxo de semente total em peso de ácido linolênico e ácido oléico é determinada por uma técnica de análise de lipídio. Esta técnica de análise de lipídio compreende uma ou mais técnicas selecionadas do grupo que

20 consiste em cromatografia de gás/detecção de ionização por chama, cromatografia de gás/espectroscopia de massa, cromatografia de camada fina/detecção de ionização por chama, cromatografia líquida/espectrometria de massa, cromatografia líquida/espectrometria de massa de ionização por eletrovaporização e cromatografia líquida/espectroscopia de massa tandem

25 de ionização por eletrovaporização.

A planta de soja que compreende um transgene que diminui a expressão de um gene FAD2-1 de soja endógena e pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena pode ser feita cruzando uma primeira linhagem origem de soja compreendendo o

30 transgene com uma segunda linhagem origem de soja compreendendo pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena para obter uma planta de soja F1 que seja heterozigoto para o

transgene e heterozigoto para pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 e então fertilizando de modo cruzado contínuo as plantas progênes F1 do cruzamento para obter uma planta de soja F2 que seja homozigoto para o referido transgene e homozigoto para pelo menos uma

5 mutação de perda de função em um gene FAD3. Em certas modalidades deste método, a segunda linhagem origem de soja compreende pelo menos duas mutações de perda de função em pelo menos dois genes FAD3 de soja endógenos. Os dois genes FAD3 de soja endógenos podem ser FAD3-1B e FAD3-1C. Neste método, a planta de soja F1 que é heterozigoto para o

10 transgene e para pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 é obtida na etapa (i) submetendo-se uma pluralidade de plantas F1 a pelo menos uma técnica de análise de DNA que permite a identificação de uma planta F1 que é heterozigoto para o referido transgene e para pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3.

15 Semelhantemente, a planta de soja F2 que é homozigoto para o transgene e homozigoto para pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 é obtida na etapa (ii) submetendo-se uma pluralidade de plantas F2 a pelo menos uma técnica de análise de DNA que permite identificação de uma planta F2 que é homozigoto para o referido transgene e homozigoto

20 para pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3. A técnica de análise de DNA compreende uma ou mais técnicas selecionadas do grupo que consiste em análise de PCR, análise de PCR quantitativa, análise de SNP, análise de AFLP, análise de RFLP e análise de RAPD. Em certas modalidades desta invenção, a técnica de análise de DNA

25 compreende a detecção de pelo menos um polimorfismo de nucleotídeo único em uma posição na sequência de gene FAD3-1C que corresponde ao nucleotídeo 687, 1129, 1203, 2316, 3292, 3360 ou 3743 de SEQ ID NO:62, detecção de uma deleção no gene FAD3-1C de SEQ ID NO:62, ou detecção de pelo menos um polimorfismo de nucleotídeo único em uma sequência

30 promotora FAD3-1C de soja que corresponde a uma guanina no nucleotídeo 334, uma citosina no nucleotídeo 364, uma timina no nucleotídeo 385, uma adenina no nucleotídeo 387, uma citosina no nucleotídeo 393, uma guanina

no nucleotídeo 729 e uma citosina no nucleotídeo 747 de SEQ ID NO:63. Em outras modalidades desta invenção, a técnica de análise de DNA compreende a detecção de um polimorfismo de nucleotídeo único em um gene FAD3-1B de soja que compreende uma substituição de um resíduo de timina para um resíduo de citosina em uma posição na sequência de gene FAD3-1b que corresponde ao nucleotídeo 2021 de SEQ ID NO:61. Neste método, o transgene pode também compreender um transgene que confere tolerância ao herbicida e a planta de soja F1 que é heterozigoto para o referido transgene é obtida na etapa (i) submetendo-se uma pluralidade de plantas F1 à seleção de herbicida para o referido transgene. Semelhantemente, quando o transgene também compreende um transgene que confere tolerância ao herbicida, uma pluralidade de plantas F2 enriquecidas para plantas de soja F2 que são homozigoto para o referido transgene é obtida na etapa (ii) submetendo-se a referida pluralidade de plantas F2 à seleção de herbicida para o referido transgene. Este método também pode ainda compreender a etapa iii) de fertilização cruzada contínua da planta progênie F2 que é homozigoto para o transgene e homozigoto para pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 da etapa (ii) para obter uma planta de soja F3.

Um método alternativo de fazer plantas de soja que compreendem um transgene que diminui a expressão de um gene FAD2-1 de soja endógena e pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena envolve a transformação direta de plantas ou células de soja que compreendem a mutação com o transgene. Deste modo esta planta de soja é feita na primeira etapa da invenção transformando-se uma planta de soja ou célula de planta que compreende pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena com um transgene que diminui a expressão de gene FAD2-1 de soja endógena para obter uma planta de soja R0 com menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 que é heterozigoto para o referido transgene, por fertilização cruzada contínua da planta progênie R0 da etapa anterior para obter uma planta de soja R1 que é homozigoto para o transgene e

homozigoto para pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3, desse modo obtendo uma planta de soja que compreende um transgene que diminui a expressão de um gene FAD2-1 de soja endógena e pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena. Em certas modalidades deste método, o transgene também compreende seqüências que conferem uma característica de tolerância ao herbicida. Em outras modalidades da invenção, o transgene também compreende seqüências que conferem tolerância ao glifosato.

Esta invenção também abrange plantas de soja produzidas pelos métodos acima mencionados da invenção como também partes de planta de plantas de soja produzidas pelos métodos da invenção. A parte de planta de soja produzida pode ser pólen, um óvulo, um meristema, uma folha, um talo, uma raiz, ou uma célula. As plantas de soja progênies das plantas de soja produzidas por estes métodos também são contempladas por esta invenção. A invenção também abrange semente da planta de soja produzida pelos métodos da invenção onde esta semente tem uma composição de ácido graxo que compreende um conteúdo de ácido linolênico de menos do que cerca de 6% de ácidos graxos de semente totais em peso e um conteúdo de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso. A invenção também abrange semente da planta de soja produzida por métodos em que as plantas de soja compreendendo pelo menos duas perdas de mutação de função em pelo menos dois genes FAD3 de soja endógenas, são usadas, a referida semente tendo uma composição de ácido graxo que compreende um conteúdo de ácido linolênico de menos do que cerca de 3% de ácidos graxos de semente totais em peso e um conteúdo de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso.

Esta invenção também fornece um método para obter uma planta de soja com uma composição de ácido graxo de óleo de semente alterada que compreende as etapas de: a) cruzar uma primeira linhagem origem de soja tendo uma composição de ácido graxo de óleo de semente que compreende um conteúdo de ácido linolênico de menos do que cerca de 3%

de ácidos graxos totais em peso com uma segunda linhagem origem de soja tendo uma composição de ácido graxo de óleo de semente em que o conteúdo de pelo menos um ácido graxo diferente de ácido linoléico é alterado em pelo menos 50% quando comparado ao conteúdo de ácido graxo correspondente de um óleo de soja de produto de consumo, a referida segunda linhagem origem de soja que compreende um transgene que altera o conteúdo de pelo menos um ácido graxo diferente de ácido linoléico; e b) obter uma planta progênie que exibe uma composição de ácido graxo de óleo de semente que compreende um conteúdo de ácido linolênico de menos do que 3% de ácidos graxos totais em peso e um conteúdo de pelo menos um ácido graxo diferente de ácido linoléico que é alterado em pelo menos 50% quando comparado ao conteúdo de ácido graxo correspondente de um óleo de soja de produto de consumo, desse modo obtendo uma planta de soja com uma composição de ácido graxo de óleo de semente alterada. Neste método, o ácido graxo diferente de ácido linolênico é selecionado do grupo que consiste em ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido estearidônico, ácido oléico, ácido linoléico, ácido γ -linoléico, ácido eicosapentanóico e ácido docosaexanóico.

A invenção também se refere a um método para produzir uma planta de soja que compreende um conteúdo de ácido linolênico de menos do que cerca de 6% de ácidos graxos de semente totais em peso, um conteúdo de ácido graxo saturado de menos do que cerca de 8% em peso e um conteúdo de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso. Este método da invenção é praticado por uma primeira etapa de preparação de uma ou mais plantas de soja que compreendem um transgene que diminui a expressão de ambos um gene FAD2-1 de soja endógena e um gene de FATB endógeno, e pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena, uma segunda etapa para obter pelo menos uma semente da referida planta de soja obtida da primeira etapa, uma terceira etapa de determinar uma porcentagem do conteúdo de ácido graxo de semente total em peso de ácido linolênico, ácidos graxos saturados e ácido oléico para a semente da

segunda etapa, e então identificar uma planta de soja que produz semente que tem uma composição de ácido graxo de semente que compreende um conteúdo de ácido linolênico de menos do que cerca de 6% de ácidos graxos de semente totais em peso, um conteúdo de ácido graxo saturado de 5 menos do que cerca de 8% em peso e um conteúdo de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso.

Em outras modalidades deste método, as plantas de soja que são feitas na primeira etapa compreendem pelo menos duas mutações de perda de função em pelo menos dois genes FAD3 de soja endógena. Esta 10 perda de mutações de função pode ser localizada nos genes FAD3-1B e FAD3-1C de soja endógena. Nesta modalidade do método, as plantas de soja identificadas na terceira etapa do método podem compreender um conteúdo de ácido linolênico de menos do que cerca de 3% de ácidos graxos de semente totais em peso, um conteúdo de ácido graxo saturado de 15 menos do que cerca de 8% em peso e um conteúdo de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso.

Em certas modalidades deste método, o transgene pode também compreender um transgene que confere tolerância ao herbicida. O transgene pode conferir tolerância ao glifosato. O transgene que confere 20 resistência ao glifosato pode codificar um gene de EPSPS de CP4.

Na terceira etapa do método, a porcentagem do conteúdo de ácido graxo de semente total em peso de ácido linolênico, ácidos graxos saturados e ácido oléico é determinada por uma técnica de análise de lipídio. Esta técnica de análise de lipídio compreende uma ou mais técnicas 25 selecionadas do grupo que consiste em cromatografia de gás/detecção de ionização por chama, espectroscopia de massa/cromatografia de gás, cromatografia de camada fina/detecção de ionização por chama, cromatografia líquida/espectrometria de massa, cromatografia líquida/espectrometria de massa de ionização por eletrovaporização e 30 cromatografia líquida/espectroscopia de massa tandem de ionização por eletrovaporização.

A planta de soja que compreende pelo menos um transgene que

diminui a expressão de ambos um gene FAD2-1 de soja endógena e um gene FATB endógeno e pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena pode ser feita cruzando uma primeira linhagem origem de soja compreendendo o transgene com uma segunda

5 linhagem origem de soja compreendendo pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena para obter uma planta de soja F1 que é heterozigoto para o transgene(s) e heterozigoto para pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 e então fertilizando de modo cruzado contínuo as plantas progênes F1 do

10 cruzamento para obter uma planta de soja F2 que é homozigoto para o referido transgene e homozigoto para pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3. Em certas modalidades deste método, a segunda linhagem origem de soja compreende pelo menos duas mutações de perda de função em pelo menos dois genes FAD3 de soja endógena. Os dois

15 genes FAD3 de soja endógena podem ser FAD3-1B e FAD3-1C. Neste método, a planta de soja F1 que é heterozigoto para o transgene e para pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 é obtida na etapa (i) submetendo uma pluralidade de plantas F1 a pelo menos uma técnica de análise de DNA que permite a identificação de uma planta F1 que

20 é heterozigoto para o referido transgene e para pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3. Semelhantemente, a planta de soja F2 que é homozigoto para o transgene e homozigoto para pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 é obtida na etapa (ii) submetendo-se uma pluralidade de plantas F2 a pelo menos uma técnica de

25 análise de DNA que permite a identificação de uma planta F2 que é homozigoto para o referido transgene e homozigoto para pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3. A técnica de análise de DNA compreende uma ou mais técnicas selecionadas do grupo que consiste em análise de PCR, análise de PCR quantitativa, análise de SNP, análise de

30 AFLP, análise de RFLP e análise de RAPD. Em certas modalidades desta invenção, a técnica de análise de DNA compreende a detecção de pelo menos um polimorfismo de nucleotídeo único em uma posição na seqüência

de gene FAD3-1C que corresponde ao nucleotídeo 687, 1129, 1203, 2316, 3292, 3360 ou 3743 da SEQ ID NO:62, ou detecção de uma deleção no gene FAD3-1C de SEQ ID NO:62, ou detecção de pelo menos um polimorfismo de nucleotídeo único em uma sequência promotora de soja

5 FAD3-1C que corresponde a uma guanina em nucleotídeo 334, uma citosina em nucleotídeo 364, uma timina em nucleotídeo 385, uma adenina em nucleotídeo 387, uma citosina em nucleotídeo 393, uma guanina em nucleotídeo 729 e uma citosina em nucleotídeo 747 de SEQ ID NO:63. Em outras modalidades desta invenção, a técnica de análise de DNA

10 compreende a detecção de polimorfismo de nucleotídeo único em um gene FAD3-1B de soja que compreende uma substituição de um resíduo de timina por um resíduo de citosina em uma posição na sequência de gene Fad3-1b que corresponde ao nucleotídeo 2021 de SEQ ID NO:61. Neste método, o transgene também pode compreender um transgene que confere tolerância

15 ao herbicida e a planta de soja F1 que é heterozigoto para o referido transgene é obtida na etapa (i) submetendo-se uma pluralidade de plantas F1 à seleção de herbicida para o referido transgene. Semelhantemente, quando o transgene também compreende um transgene que confere tolerância ao herbicida, uma pluralidade de plantas F2 enriquecida para

20 planta de sojas F2 que são homozigoto para o referido transgene é obtida na etapa (ii) submetendo-se a referida pluralidade de plantas F2 à seleção de herbicida para o referido transgene. Este método também pode ainda compreender a etapa iii) de fertilização cruzada contínua da planta progênie F2 que é homozigoto para o transgene e homozigoto para pelo menos uma

25 mutação de perda de função em um gene FAD3 da etapa (ii) para obter uma planta de soja F3.

Um método alternativo de fabricar plantas de soja que compreendem pelo menos um transgene que diminui a expressão de ambos um gene FAD2-1 de soja endógena e um gene FATB de soja endógena e

30 um gene FATB endógeno e pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena, envolve a transformação direta de plantas ou células de soja que compreendem a mutação com o transgene(s).

Deste modo esta planta de soja é feita na primeira etapa da invenção transformando-se uma planta ou célula de planta de soja que compreende pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena com um ou mais transgene(s) que diminui a expressão de ambos

5 um gene FAD2-1 de soja endógena e um gene FATB de soja endógena para obter uma planta de soja R0 com pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 que é heterozigoto para o referido transgene, fertilizando de modo cruzado contínuo a planta progênie R0 da etapa anterior para obter uma planta de soja R1 que é homozigoto para o

10 transgene e homozigoto para pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3, desse modo obtendo uma planta de soja que compreende um transgene que diminui a expressão de um gene FAD2-1 de soja endógena e pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena. Em certas modalidades deste método, o transgene

15 também compreende seqüências que conferem uma característica de tolerância ao herbicida. Em outras modalidades da invenção, o transgene também compreende seqüências que conferem tolerância ao glifosato.

Esta invenção também abrange plantas de soja produzidas pelos métodos acima mencionados da invenção como também partes de

20 planta de plantas de soja produzidas pelos métodos da invenção. A parte de planta de soja produzida pode ser pólen, um óvulo, um meristema, uma folha, um talo, uma raiz, ou uma célula. As plantas de soja progênies das plantas de soja produzidas por estes métodos também são contempladas por esta invenção. A invenção também abrange semente da planta de soja

25 produzida pelos métodos da invenção onde esta semente tem uma composição de ácido graxo que compreende um conteúdo de ácido linolênico de menos do que cerca de 6% de ácidos graxos de semente totais em peso, um conteúdo de ácido graxo saturado de menos que 8% em peso e um conteúdo de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos

30 graxos de semente totais em peso. A invenção também abrange semente da planta de soja produzida por métodos em que as plantas de soja compreendendo pelo menos duas mutações de perda de função em pelo

menos dois genes FAD3 de soja endógena são usadas, a referida semente tendo uma composição de ácido graxo que compreende um conteúdo de ácido linolênico de menos do que cerca de 3% de ácidos graxos de semente totais em peso, um conteúdo de ácido graxo saturado de menos do que 8% em peso e um conteúdo de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso.

As características e vantagens adicionais da presente invenção, como também a estrutura e operação de várias modalidades da presente invenção, são descritas em detalhes abaixo com referência para aos desenhos acompanhantes.

Breve Descrição dos Desenhos

Os desenhos acompanhantes, que estão incorporados em e formam uma parte do relatório descritivo, ilustram as modalidades da presente invenção e juntos com a descrição, servem para explicar os princípios da invenção. Nos desenhos:

Figura 1 ilustra pCGN5469, um vetor de planta para diminuir a expressão do gene FAD2-1 de soja;

Figura 2 ilustra pCGN5471, um vetor de planta para diminuir a expressão do gene FAD2-1 de soja;

Figura 3 ilustra pCGN5485, um vetor de planta para diminuir a expressão do gene FAD2-1 de soja; e

Figura 4 ilustra configurações de vetor de planta exemplares para diminuir a expressão de um ou mais genes usando os elementos da sequência de DNA dos genes de soja listados na Tabela 1.

Figura 5 ilustra as configurações de vetor de planta exemplares para diminuir a expressão de um ou mais genes usando os elementos da sequência de DNA dos genes FAD2-1 de soja e/ou FATB de soja listados na Tabela 2.

Figura 6 ilustra vetores de planta exemplares para diminuir a expressão de ambos os genes FAD2-1 e FATB de soja endógena.

Descrição Detalhada da Invenção

A descrição das seqüências de ácido nucléico

SEQ ID NO: 1 é uma seqüência de ácido nucléico de um íntron 1 de FAD2-1A.

SEQ ID NO: 2 é uma seqüência de ácido nucléico de um íntron 1 de FAD2-1A.

5

SEQ ID NO: 3 é uma seqüência de ácido nucléico de um promotor de FAD2-1B.

SEQ ID NO: 4 é uma seqüência de ácido nucléico de um clone genômico de FAD2-1A.

10

SEQ ID NOs: 5 & 6 são seqüências de ácido nucléico de um 3' UTR e 5'UTR de FAD2-1A, respectivamente.

SEQ ID NOs: 7-13 são seqüências de ácido nucléico de íntrons 1, 2, 3A, 4, 5, 3B, e 3C de FAD3-1A, respectivamente.

15

SEQ ID NO: 14 é uma seqüência de ácido nucléico de um íntron 4 de FAD3-1C.

SEQ ID NO: 15 é uma seqüência de ácido nucléico de um clone genômico parcial de FAD3-1A.

SEQ ID NOs: 16 & 17 são seqüências de ácido nucléico de um 3'UTR e 5'UTR FAD3-1A, respectivamente.

20

SEQ ID NO: 18 é uma seqüência de ácido nucléico de um clone genômico parcial de FAD3-1B.

SEQ ID NOs: 19-25 são seqüências de ácido nucléico de íntrons 1, 2, 3A, 3B, 3C, 4, e 5 de FAD3-1B, respectivamente.

25

SEQ ID NOs: 26 & 27 são seqüências de ácido nucléico de um 3'UTR e 5'UTR de FAD3-1B, respectivamente.

SEQ ID NO: 28 é uma seqüência de ácido nucléico de um clone genômico de FATB-1.

SEQ ID NOS: 29-35 são seqüências de ácido nucléico de íntrons I, II, III, IV, V, VI, e VII de FATB-1, respectivamente.

30

SEQ ID NOs: 36 & 37 são seqüências de ácido nucléico de um 3'UTR e 5'UTR FATB-1, respectivamente.

SEQ ID NO: 38 é uma seqüência de ácido nucléico de um gene de *Cuphea pulcherrima* KAS I.

SEQ ID NO: 39 é uma seqüência de ácido nucléico de um gene de *Cuphea pulcherrima* KAS IV.

5 SEQ ID NOs: 40 & 41 são seqüências de ácido nucléico de genes de delta-9 dessaturase de *Ricinus communis* e *Simmondsia chinensis*, respectivamente.

SEQ ID NO: 42 é uma seqüência de ácido nucléico de um cDNA de FATB-2.

10 SEQ ID NO: 43 é uma seqüência de ácido nucléico de um clone genômico de FATB-2.

SEQ ID NOs: 44-47 são seqüências de ácido nucléico de íntrons I, II, III, e IV de FATB-2 respectivamente.

15 SEQ ID NOs: 48-60 são seqüências de ácido nucléico de iniciadores de PCR.

SEQ ID NO:61 é uma seqüência de gene FAD3-1B que corresponde à SEQ ID NO:1 do Pedido de Patente U.S. No. 10/176.149.

SEQ ID NO: 62 é uma seqüência de gene FAD3-1C que corresponde à SEQ ID NO:2 do Pedido de Patente U.S. No. 10/176.149.

20 SEQ ID NO:63 é uma seqüência promotora de FAD3-1C que corresponde à SEQ ID NO:3 do Pedido de Patente U.S. No. 10/176.149..

Definições

"ACP" se refere a uma porção de proteína veículo de acila. "Composição de óleo de semente alterada" se refere a uma composição de
25 óleo de semente de uma planta transgênica ou transformada da invenção que alterou ou modificou os níveis dos ácidos graxos nesta, relativo a um óleo de semente de uma planta que tem uma base genética semelhante porém que não foi transformada. "Supressão de anti-sentido" se refere ao silenciamento específico de gene que é induzido pela introdução de uma
30 molécula de RNA anti-sentido.

"Agronomicamente elite", como usado aqui, significa um genótipo que tem uma culminação de muitas características distinguíveis tal

como emersão, vigor, vigor vegetativo, resistência à doença, conjunto de semente, padronização e debulhabilidade que permitem um produtor colher um produto de significância comercial.

"Alelo" como usado aqui, se refere a qualquer de uma ou mais formas alternativas de um local de gene, todos dos quais alelos se referem a um traço ou característica. Em uma célula ou organismo diplóide, os dois alelos de um determinado gene ocupam lugares correspondentes em um par de cromossomos homólogos.

"Cruzamento reversível" como usado aqui, se refere a um processo no qual um criador cruza repetidamente a progênie híbrida, por exemplo, uma primeira geração híbrida (F1), de novo para um dos pares da progênie híbrida. O cruzamento reversível pode ser usado para introduzir uma ou mais conversões de local único de uma base genética em outra.

"Coexpressão de mais do que um agente tal como um mRNA ou proteína" se refere à expressão simultânea de um agente em estruturas de tempo de sobreposição e na mesma célula ou tecido como outro agente. "Expressão coordenada de mais de um agente" se refere à coexpressão de mais do que um agente quando a produção de transcrições e proteínas de tais agentes é realizada utilizando um promotor compartilhado ou o idêntico.

"Complemento" de uma sequência de ácido nucléico se refere ao complemento da sequência ao longo de seu comprimento completo.

"Co-supressão" é a redução em níveis de expressão, normalmente no nível de RNA, de um gene endógeno particular ou família de gene pela expressão de um construto de sentido homólogo que é capaz de transcrever mRNA da mesma fita como a cópia do gene endógeno. Napoli e outros, Plant Cell 2:279-289 (1990); van der Krol e outros, Plant Cell 2:291-299 (1990).

Um gene de "CP4 EPSPS" ou "CP4 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase" codifica uma enzima (CP4 EPSPS) capaz de conferir um grau significativo de resistência ao glifosato na célula de planta e plantas geradas desta. A sequência de EPSPS CP4 pode ser uma sequência de EPSPS CP4 derivada de *Agrobacterium tumefaciens* sp. CP4 ou uma forma

variante ou sintética deste, como descrito na Patente U.S. No. 5.633.435. As seqüências de EPSPS CP4 representativas incluem, sem limitação, aquelas apresentadas nas Patentes U.S. Nos. 5.627.061 e 5.633.435.

5 "Cruzamento", como usado aqui, se refere ao acasalamento de duas plantas origem.

"Polinização cruzada", como usado aqui, se refere à fertilização pela união de dois gametas de plantas diferentes.

"F1" ou "F1", como usado aqui, se refere à primeira progênie de geração do cruzamento das duas plantas.

10 "F1 Híbrido" ou "F1 Híbrido", como usado aqui, se refere a primeira progênie de geração do cruzamento de duas plantas não-isogênicas.

"F2" ou "F2", como usado aqui, se refere à segunda progênie de geração do cruzamento das duas plantas.

15 "F3" ou "F3", como usado aqui, se refere à segunda progênie de geração do cruzamento de duas plantas.

"Óleo de soja bruto" se refere ao óleo de soja que foi extraído de sementes de soja, porém não foi refinado, processado, ou misturado, embora possa ser desengomado.

20 "CTP" se refere a um peptídeo de trânsito cloroplástico, codificado pela "seqüência de codificação de peptídeo de trânsito cloroplástico".

Ao se referir às proteínas e ácidos nucléicos aqui, "derivado" se refere ou diretamente (por exemplo, olhando na seqüência de uma proteína ou ácido nucléico conhecido e preparando uma proteína ou ácido nucléico
25 que tenha uma seqüência similar, pelo menos em parte, à seqüência da proteína ou ácido nucléico conhecido) ou indiretamente (por exemplo, obtendo uma proteína ou ácido nucléico de um organismo que está relacionado com uma proteína ou ácido nucléico conhecido) obtendo uma
30 proteína ou ácido nucléico de uma proteína ou ácido nucléico conhecido. Outros métodos "derivando" de uma proteína ou ácido nucléico de uma proteína ou ácido nucléico conhecido são conhecidos por alguém de

experiência na técnica.

RNA de filamento duplo ("dsRNA"), interferência de RNA de filamento duplo ("dsRNAi") e interferência de RNA ("RNAi") todos se referem ao silenciamento específico de gene que é induzido pela introdução de um
5 constructo capaz de transcrever uma molécula de RNA pelo menos parcialmente de filamento duplo. Uma "molécula de dsRNA" e uma "molécula de RNAi" se referem a uma região de uma molécula de RNA que contém segmentos com seqüências de nucleotídeo complementares e portanto podem hibridizar entre si e formar o RNA de filamento duplo. Tais
10 moléculas de RNA de filamento duplo são capazes, quando introduzidas em uma célula ou organismo, de pelo menos parcialmente reduzir o nível de uma espécie de mRNA presente em uma célula ou uma célula de um organismo. Além disso, o dsRNA pode ser criado após montagem in vivo de fragmentos de DNA apropriados por recombinação ilegítima e recombinação
15 específica de sítio como descrito no Pedido Internacional No. PCT/US2005/004681, depositado em 11 de fevereiro de 2005, que está desse modo incorporado pela referência em sua totalidade.

"Exon" se refere ao sentido normal do termo quando significando um segmento de moléculas de ácido nucléico, normalmente DNA, que
20 codifica parte ou tudo de uma proteína expressa.

"FAD2" se refere a um gene ou proteína codificada capaz de catalisar a inserção de uma ligação dupla em uma porção de acila graxa na décima segunda posição contada do terminal de carboxila. As proteínas FAD2 também são referidas como " Δ 12 dessaturase" ou "omega-6
25 dessaturase". O termo "FAD2-1" é usado para se referir a uma proteína ou gene FAD2 que seja expresso naturalmente de uma maneira específica em tecido de semente, e o termo "FAD2-2" é usado para se referir a uma proteína ou gene FAD2 que seja (a) um gene diferente de uma proteína ou gene FAD2-1 e (b) seja expresso naturalmente em tecidos múltiplos,
30 incluindo a semente. As seqüências FAD2 representativas incluem, sem limitação, aquelas apresentadas no Pedido de Patente U.S. No. 10/176.149, depositado no dia 21 de junho de 2002, e em SEQ ID NOs: 1-6.

Um gene "FAD3", " $\Delta 15$ dessaturase" ou "omega-3 dessaturase" codifica uma enzima (FAD3) capaz de catalisar a inserção de uma ligação dupla em uma porção de acila graxa na décima quinta posição contada do terminal de carboxila. Os termos "FAD3-1, FAD3-A, FAD3-B e FAD3-C" são
5 usados para se referir aos membros da família de gene FAD3 que são expressos naturalmente em tecidos múltiplos, incluindo a semente. As seqüências FAD3 representativas incluem, sem limitação, aquelas apresentadas no Pedido de Patente U.S. No. 10/176.149 depositado no dia 21 de junho de 2002, e em SEQ ID NOs: 7-27.

10 Um "FATB" ou "palmitoil-ACP tioesterase" se refere a um gene que codifica uma enzima (FATB) capaz de catalisar a clivagem hidrolítica da ligação de tioéster de enxofre ao carbono no grupo protético de pantoteno de palmitoil-ACP como sua reação preferida. A hidrólise de outros tioésteres de ACP de ácido graxo também pode ser catalisada por esta enzima. As
15 seqüências FATB-1 representativas incluem, sem limitação, aquelas apresentadas no Pedido Provisório U.S. No. 60/390.185, depositado no dia 21 de junho de 2002; as Patentes U.S. Nºs 5.955.329; 5.723.761; 5.955.650; e 6.331.664; e SEQ ID NOs: 28-37. As seqüências FATB-2 representativas incluem, sem limitação, aquelas apresentadas nas SEQ ID NOs: 42-47.

20 "Ácido graxo" se refere aos ácidos graxos livres e grupos de acila graxa.

"Gene" se refere a uma seqüência de ácido nucléico que abrange uma região promotora 5' associada com a expressão do produto de gene, quaisquer regiões de íntron e exon e regiões não transladas 3' ou 5'
25 associadas com a expressão do produto de gene.

"Silenciamento de gene" se refere à supressão de expressão de gene ou sub-regulação de expressão de gene.

Uma "família de gene" é dois ou mais genes em um organismo que codifica as proteínas que exibem atributos funcionais similares, e um
30 "membro de família de gene" é qualquer gene da família de gene encontrado dentro do material genético da planta, por exemplo, um "membro da família de gene FAD2" é qualquer gene FAD2 encontrado dentro do material

genético da planta. Um exemplo de dois membros de uma família de gene é FAD2-1 e FAD2-2. Uma família de gene pode ser adicionalmente classificada pela semelhança das seqüências de ácido nucléico. Um gene, FAD2, por exemplo, inclui alelos naquele local. Preferivelmente, um membro da família de gene exibe pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 80% de identidade de seqüência de ácido nucléico na porção de seqüência de codificação do gene.

"Genótipo", como usado aqui, se refere à constituição genética de uma célula ou organismo.

10 Como usado aqui, "Heterólogo" significa de ocorrência não natural junto.

 Uma molécula de ácido nucléico é dita ser "introduzida" se for inserida em uma célula ou organismo como resultado de manipulação humana, de qualquer forma indireta. Os exemplos de moléculas de ácido nucléico introduzidas incluem, porém não estão limitados aos ácidos nucléicos que foram introduzidos em células por transformação, transfecção, injeção, e projeção, e aqueles que foram introduzidos em um organismo por métodos incluindo, porém não limitado a, conjugação, endocitose, e fagocitose.

20 "Intron" se refere ao sentido normal do termo como significando um segmento de moléculas de ácido nucléico, normalmente DNA, que não codifica parte ou tudo de uma proteína expressa, e que, em condições endógenas, é transcrito em moléculas de RNA, porém que é removido do RNA endógeno antes do RNA ser translado em uma proteína. Uma

25 "molécula de dsRNA de íntron" e uma "molécula de RNAi íntron" ambos se referem a uma molécula de RNA de filamento duplo capaz, quando introduzido em uma célula ou organismo, de pelo menos parcialmente reduzir o nível de uma espécie de mRNA presente em uma célula ou uma célula de um organismo onde a molécula de RNA de filamento duplo exibe

30 identidade suficiente para um íntron de um gene presente na célula ou organismo para reduzir o nível de um mRNA que contém aquela seqüência de íntron.

Uma composição de óleo de semente de soja "pouco saturada" contém entre 3,6 e 8 por cento de ácidos graxos saturados em peso.

Uma composição de óleo "pouco linolênico" contém menos do que cerca de 3% de ácido linolênico em peso dos ácidos graxos totais em peso.

Uma "semente de soja meio oléica" é uma semente que tem entre 55% e 85% de ácido oléico presente na composição de óleo da semente em peso.

O termo "não-codificação" se refere às seqüências de moléculas de ácido nucléico que não codificam parte ou tudo de uma proteína expressa. As seqüências de não-codificação incluem, porém não estão limitadas a introns, regiões promotoras, regiões não transladas 3' (3'UTRs), e regiões não transladas 5' (5'UTRs).

O termo "composição de óleo" se refere aos níveis de ácidos graxos.

"Fenótipo", como usado aqui, se refere às características detectáveis de uma célula ou organismo, cujas características são a manifestação de expressão de gene.

Um promotor que é "operavelmente ligado" a uma ou mais seqüências de ácido nucléico é capaz de direcionar a expressão de uma ou mais seqüências de ácido nucléico, incluindo seqüências de ácido nucléico de codificação e não-codificação múltiplas dispostas em uma configuração policistrônica.

Seqüências de ácido nucléico "fisicamente ligadas" são seqüências de ácido nucléico que são encontradas em uma única molécula de ácido nucléico. Uma "planta" inclui referência a plantas inteiras, órgãos de planta (por exemplo, folhas, talos, raízes, etc.), sementes, e células de planta e progênie do mesmo. O termo "célula de planta" inclui, sem limitação, culturas de suspensão de semente, embriões, regiões meristemáticas, tecido de calo, folhas, raízes, brotos, gametófitos, esporófitos, pólen, e microesporos. "Promotores de planta", incluem, sem limitação, promotores virais de planta, os promotores derivados de plantas, e

os promotores sintéticos capazes de funcionar em uma célula de planta para promover a expressão de um mRNA.

Um "gene policistrônico" ou "mRNA policistrônico" é qualquer gene ou mRNA que contém seqüências de ácido nucléico transcritas que correspondem às seqüências de ácido nucléico de mais do que um gene alvejado para supressão. É entendido que tais genes policistrônicos ou mRNAs podem conter seqüências que correspondem aos introns, 5'UTRs, 3'UTRs, seqüências de codificação de peptídeo de trânsito, exons, ou combinações destes, e que um gene policistrônico recombinante ou mRNA pode, por exemplo sem limitação, conter seqüências que correspondem a um ou mais UTRs de um gene e um ou mais íntrons de um segundo gene.

Como usado aqui, o termo "R0", "R0", "geração de R0" ou "geração de R0" se refere a uma planta transformada obtida por regeneração de uma célula de planta transformada.

Como usado aqui, o termo "R1", "R1", "geração de R1" ou "geração de R1" se refere às sementes obtidas de uma planta R0 transgênica fertilizada de modo cruzado contínuo. As plantas de R1, são crescidas das sementes de R1.

Um "promotor específico de semente" se refere a um promotor que é preferencialmente ou exclusivamente ativo em uma semente. "Atividade preferencial" se refere à atividade promotora que é substancialmente maior na semente do que em outros tecidos, órgãos ou organelas da planta. "Específico de semente" inclui sem limitação atividade na camada de aleurona, endosperma, embrião e/ou da semente.

"Supressão de íntron de sentido" se refere ao silenciamento de gene que é induzido pela introdução de um íntron de sentido ou fragmento deste. Supressão de íntron de sentido é descrita, por exemplo, por Fillatti em PCT WO 01/14538 A2.

"Expressão simultânea" de mais do que um agente tal como um mRNA ou proteína se refere à expressão de um agente ao mesmo tempo que outro agente. Tal expressão pode somente se sobrepor em parte e também pode ocorrer em tecido diferente ou em níveis diferentes.

"Nível de óleo total" se refere à quantidade de agregado total de ácido graxo sem levar em conta o tipo de ácido graxo. Como usado aqui, o nível de óleo total não inclui a cadeia principal de glicerol.

5 "Transgene" se refere a uma seqüência de ácido nucléico associada com a expressão de um gene introduzida em um organismo. Um transgene inclui, porém não está limitado a, um gene endógeno ou um gene de ocorrência não natural no organismo.

10 Uma "planta transgênica" é qualquer planta que estavelmente incorpora um transgene de uma maneira que facilita a transmissão daquele transgene de uma planta por qualquer método sexual ou assexual.

Uma composição de óleo de semente de soja "zero saturada" contém menos do que 3,6 por cento de ácidos graxos saturados em peso.

15 Uma "mutação de perda de função" é uma mutação na seqüência de codificação de um gene, que faz com que a função do produto de gene, normalmente uma proteína, ou seja reduzida ou completamente ausente. Por exemplo, uma mutação de perda de função pode ser causada pela truncação do produto de gene por causa de uma mutação de deslocamento ou sem sentido. Um fenótipo associado com um alelo com uma mutação de perda de função pode ser recessivo ou dominante.

20 Uma célula ou organismo pode ter uma família de mais do que um gene que codifica uma enzima particular, e a letra maiúscula que segue a terminologia de gene (A, B, C) é usada para designar o membro da família, isto é, FAD2-1A é um membro da família de gene diferente de FAD2-1B. Semelhantemente, FAD3-1A, FAD3-1B, e FAD3-1C representam os
25 membros distintos da família de gene FAD3-1. A perda de alelos de função de vários genes é representada em minúscula seguida por um sinal de menos (isto é, fad3-1b - e fad3-1c - representa perda de alelos de função dos genes FAD3-1B e FAD3-1C, respectivamente).

30 Como usado aqui, qualquer faixa apresentada é inclusiva dos pontos finais da faixa a menos que de outro modo declarado.

A. Transgene que diminui a expressão do gene FAD2-1 de soja endógena

Vários transgenes que diminuem a expressão do gene FAD2-1 de soja endógena podem ser usados para praticar os métodos da invenção. Ao suprimir, pelo menos parcialmente reduzir, reduzir, substancialmente reduzir, ou eliminar a expressão do gene de FAD2 endógeno efetivamente, a

5 quantidade de proteína FAD2 disponível em uma célula de planta é diminuída, isto é, os níveis de estado constante da proteína FAD2 são reduzidos. Deste modo, uma diminuição na expressão de proteína FAD2 na célula de soja pode resultar em uma proporção aumentada de ácidos graxos mono-insaturados tal como oleato (C18:1). As plantas de soja que contêm

10 transgenes que diminuem a expressão da soja endógena FAD2-1 e produzem semente com ácido oléico aumentado são descritas na Patente U.S. Nº 7.067.722.

Vários transgenes que diminuem a expressão tanto de uma soja endógena FAD2-1 quanto um gene FATB de soja endógena podem ser

15 usados para praticar os métodos da invenção para produção de plantas de soja com um fenótipo de ácido pouco linolênico, pouco saturado, meio oléico. Ao suprimir, pelo menos parcialmente reduzir, reduzir, substancialmente reduzir, ou efetivamente eliminar a expressão do gene FATB endógeno, a quantidade de proteína FATB disponível em uma célula

20 de planta é diminuída, isto é os níveis de estado constante da proteína FATB são reduzidos. Quando a quantidade de FATB é diminuída em uma célula de planta, uma quantidade diminuída de ácidos graxos saturados tal como palmitato e estearato, pode ser fornecida. Deste modo, uma diminuição de FATB pode resultar em uma proporção aumentada de ácidos graxos não

25 saturados tal como oleato (18:1).

Vários métodos para diminuir a expressão de qualquer um: 1) o gene(s) FAD2-1 de soja endógeno ou 2) ambos os genes de FAD2-1 e FATB de soja endógena em plantas de soja e semente são contemplados por esta invenção, incluindo, porém não limitado a, supressão de anti-

30 sentido, co-supressão, ribozimas, combinações de sentido e anti-sentido (RNAi de filamento duplo), silenciamento de promotor, e uso de proteínas de ligação de DNA tal como proteínas de ligador de zinco. A prática geral

destes métodos com respeito aos vários genes de planta endógenos é descrita em WO 98/53083, WO 01/14538, e Patente U.S. 5.759.829. A supressão de expressão de gene em plantas, também conhecida como silenciamento de gene, ocorre tanto no nível transcricional quanto no nível

5 pós-transcricional. Certo destes mecanismos de silenciamento de gene, são associados com homologia de ácido nucléico no nível de DNA ou RNA. Tal homologia se refere à semelhança em seqüências de DNA ou proteína dentro das mesmas espécies ou entre espécies diferentes. O silenciamento de gene ocorre se a seqüência de DNA introduzida em uma célula

10 hospedeira for suficientemente homóloga a um gene endógeno cuja transcrição da seqüência de DNA introduzida induzirá ao silenciamento de gene transcricional ou pós-transcricional do gene endógeno. Para praticar esta invenção, as seqüências de DNA com pelo menos 50%, cerca de 60%, ou cerca de 70% idênticas no comprimento total de uma seqüência de DNA

15 de uma região de codificação ou região de não-codificação de FAD2-1 ou FATB de soja, ou para uma seqüência de ácido nucléico que é complementar a uma região de codificação ou não-odificação FAD2-1 ou FATB de soja, têm homologia suficiente para supressão de níveis de expressão de estado constante de FAD2-1 ou FATB quando introduzidos em

20 plantas de soja como transgenes. Os transgenes da invenção compreendem seqüências de DNA que são, em seu comprimento total, mais preferivelmente pelo menos 80% idênticas; pelo menos 85% idênticas; pelo menos 90% idênticas; pelo menos 95% idênticas; pelo menos 97% idênticas; pelo menos 98% idênticas; pelo menos 99% idênticas; ou 100% idênticas a

25 uma região de codificação ou região de não-codificação do gene FAD2-1 ou FATB de soja, ou a uma seqüência de ácido nucléico que é complementar a uma região de codificação ou não-codificação de gene de FAD2-1 ou FATB de soja. As seqüências de DNA com os níveis indicados acima de identidade para o gene(s) FAD2-1 ou FAT de soja podem ser seqüências de

30 codificação, seqüências de íntron, seqüências 3'UTR, seqüências 5'UTR, seqüências promotoras, outras seqüências de não-codificação, ou qualquer combinação dos anteriores. O íntron pode ser localizado entre os exons, ou

localizado em um UTR 5' ou 3' de um gene de planta. A sequência de codificação é preferivelmente uma fração de uma estrutura de codificação de proteína que não codifica uma proteína com atividade enzimática de FAD2. Entretanto, é reconhecido que em certos casos, tal como em co-supressão,

5 as seqüências de DNA que codificam uma proteína de FATB ou FAD2 enzimaticamente ativa podem ser usadas para diminuir a expressão do gene(s) FAD2-1 ou de FATB de soja endógena.

Também é entendido que as seqüências de DNA com os níveis indicados acima de identidade para o gene FAD2-1 de soja que são úteis

10 nos métodos desta invenção podem ser derivadas de qualquer gene FAD2 de soja, o gene FAD2-1A de soja (SEQ ID NO:4), o íntron FAD2-1A de soja (SEQ ID NO:1), íntrons FAD2-1B de soja (SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:3), o gene FAD2-2 de soja, alelos do gene FAD2-1 de soja, alelos do gene FAD2-2 de soja, e de genes FAD2 derivados de outras plantas leguminosas tal

15 como *Medicago* sp., *Pisum* sp., *Vicia* sp., *Phaseolus* sp., e *Pisum* sp. Está deste modo claro que a seqüência de DNA com os níveis indicados de identidade para a seqüência de FAD2-1 de soja pode ser derivada de múltiplas fontes. As seqüências de DNA com os níveis indicados de identidade de seqüência também podem ser obtidas sinteticamente.

20 Semelhantemente, também é entendido que as seqüências de DNA com os níveis indicados acima de identidade para o gene FATB de soja que são úteis nos métodos desta invenção podem ser derivadas de qualquer gene FATB de soja, um gene FATB-1 de soja (SEQ ID NO:28), íntrons FATB-1 de soja (SEQ ID NOS:29-35), FATB-1 5'UTR de soja (SEQ ID

25 NO:36), FATB-1 3'UTR de soja (SEQ ID NO:37), o gene FATB-2 de soja (SEQ ID NO:43), alelos do FATB-1 soja, alelos do gene FATB-2 de soja, e de genes FATB derivados de outras plantas leguminosas tal como *Medicago* sp., *Pisum* sp., *Vicias* sp., *Phaseolus* sp., e *Pisum* sp. Está deste modo claro que a seqüência de DNA com os níveis indicados de identidade para a

30 seqüência FAD2-1 de soja pode ser derivada de fontes múltiplas. As seqüências de DNA com os níveis indicados de identidade de seqüência também podem ser obtidas sinteticamente.

Nos métodos desta invenção, os transgenes especificamente designados para produzir as moléculas de RNA de filamento duplo (dsRNA) com homologia para o gene FAD2-1 também podem levar ao silenciamento específico de seqüência FAD2-1 e podem ser usados para diminuir a expressão do gene FAD2-1 de soja endógena. As seqüências de filamento de sentido do dsRNA podem ser separadas das seqüências de anti-sentido por uma seqüência espaçadora, preferivelmente uma que promova a formação de uma molécula de dsRNA. Os exemplos de tais seqüências espaçadoras incluem aqueles apresentados em Wesley e outros, Plant J., 27(6):581-90 (2001), e Hamilton e outros, Plant J., 15:737-746 (1988). Em um aspecto preferido, a seqüência espaçadora é capaz de formar uma estrutura de grampo como ilustrado em Wesley e outros, supra. As seqüências espaçadoras particularmente preferidas neste contexto são íntrons de planta ou partes destes. Um íntron de planta particularmente preferido é um íntron ligável. Os íntrons ligáveis incluem, porém não estão limitados a, um íntron selecionado do grupo que consiste em íntron PDK, íntron No. 5 FAD3-1A ou FAD3-1B, íntron No. 1FAD3, íntron No. 3A de FAD3, íntron No. 3B de FAD3, íntron No. 3C de FAD3, íntron No. 4 de FAD3, íntron No. 5 de FAD3, íntron No. 1 de FAD2, e íntron de FAD2-2. As moléculas de sentido orientado de não-codificação podem ser, opcionalmente separadas das moléculas anti-sentido orientadas correspondentes por um segmento espaçador de DNA. O segmento espaçador pode ser um fragmento de gene ou o DNA artificial. O segmento espaçador pode ser curto para facilitar a formação do dsRNA de grampo de cabelo ou longo para facilitar dsRNA sem uma estrutura de grampo de cabelo. O espaçador pode ser fornecido estendendo-se o comprimento de uma das moléculas de sentido ou anti-sentido como descrito na US 2005/0176670 A1. Alternativamente, uma seqüência borda direita – borda direita ("RB-RB") pode ser criada após a inserção no genoma de planta como descrito no Pedido de Patente U.S. 2005/0183170.

Os transgenes da invenção tipicamente incluirão um promotor funcional em uma célula de planta, ou um promotor de planta que é

operavelmente unido a uma seqüência de DNA acima mencionada que diminui a expressão de um gene FAD2-1 ou FATB de soja endógena. O projeto de um tal vetor geralmente está dentro da capacidade da técnica (Veja, por exemplo, *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Clark (ed.), Springer, Nova Iorque (1997)). Entretanto, é reconhecido que os constructos ou vetores também podem conter um gene sem promotor que pode utilizar um promotor endógeno em inserção. Vários promotores que são ativos em células de planta foram descritos na literatura tal como os promotores de CaMV 35S e FMV. As versões realçadas ou duplicadas dos promotores CaMV 35S e FMV 35S também podem ser usadas para expressar uma seqüência de DNA acima mencionada que diminui a expressão de um gene FAD2-1 endógeno (Odell e outros, *Nature* 313: 810-812 (1985); Patente U.S. No. 5.378.619). Os promotores adicionais que podem ser utilizados são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. 5.378.619; 5.391.725; 5.428.147; 5.447.858; 5.608.144; 5.608.144; 5.614.399; 5.633.441; 5.633.435; e 4.633.436. Além disso, um realçador específico de tecido pode ser usado com um promotor de planta basal. Os promotores basais compreendem tipicamente uma caixa "TATA" e um sítio de estrutura de mRNA porém necessita de elementos realçadores requeridos para níveis elevados de expressão.

Os promotores particularmente preferidos para uso nos transgenes da presente invenção são promotores que expressam uma seqüência de DNA que diminui a expressão de um gene FAD2-1 ou FATB de soja endógena em sementes ou frutas. Realmente, em uma modalidade preferida, o promotor usado é um promotor específico de semente. Os exemplos de tais promotores específicos de semente incluem as regiões reguladoras 5' de tais genes como napin (Kridl e outros, *Seed Sci. Res.* 1:209-219 (1991)), faseolina, estearoil-ACP dessaturase, 7S α , 7S α ' (Chen e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:8560-8564 (1986)), USP, arcelin e oleosina. Os promotores preferidos para expressão na semente são promotores de 7S α , 7 α ', napin, e FAD2-1A.

Os constructos ou vetores também incluirão tipicamente um

terminador transcricional 3' ou sinal de poliadenilação 3' que é operavelmente ligado a uma seqüência de DNA acima mencionada que diminui expressão de um gene FAD2-1 ou FATB de soja endógena. O sinal de terminação transcricional pode ser qualquer sinal de terminação transcricional funcional em uma planta, ou qualquer sinal de terminação transcricional de planta. Os sinais de terminação transcricionais preferidos incluem, porém não estão limitados a, uma seqüência de ervilha Rubisco E9 3', uma seqüência de Brassica napin 3', uma seqüência de tml 3', e uma seqüência de gene 3' de nopalina sintase (NOS) de plasmídeo de indução de tumor (Ti) de Agrobactéria. É entendido que este grupo de regiões de poliadenilação exemplares seja não limitante e alguém versado na técnica poderia empregar outras regiões de poliadenilação que não são citadas aqui explicitamente na prática desta invenção.

Finalmente, também é reconhecido que podem ser inseridos transgenes da invenção em vetores de transformação de planta que também compreendem genes que codificam marcadores selecionáveis ou de classificáveis. O gene marcador selecionável pode ser um gene que codifica uma proteína de neomicina fosfotransferase, uma proteína de fosfinotricina acetiltransferase, uma proteína de 5-enol-piruvilchiquimato-3-fosfato sintase resistente ao glifosato (EPSPS), uma proteína de higromicina fosfotransferase, uma proteína de diidropteroato sintase, uma proteína de acetolactato sintase insensível à sulfoniluréia, uma proteína Q insensível à atrazina, uma proteína de nitrilase capaz de degradar bromoxinila, uma proteína de dealogenase capaz de degradar dalapon, uma proteína de 2,4-diclorofenoxiacetato monoxigenase, uma proteína de diidrofolato reductase insensível a metotrexato, e uma proteína de octopina sintase insensível a aminoetilcisteína. Os agentes seletivos correspondentes usados junto com cada gene podem ser: neomicina (para seleção de proteína neomicina fosfotransferase), fosfinotricina (para seleção de proteína fosfinotricina acetiltransferase), glifosato (para seleção de proteína 5-enol-piruvilchiquimato-3-fosfato sintase resistente ao glifosato (EPSPS)), higromicina (para seleção de proteína higromicina fosfotransferase),

sulfadiazina (para uma seleção de proteína diidropteroato sintase), clorsulfurona (para uma seleção de proteína acetolactato sintase insensível à sulfoniluréia), atrazina (para uma seleção de proteína Q insensível à atrazina), bromoxinila (para uma seleção de proteína nitrilase), dalapon (para uma seleção de proteína dealogenase), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (para uma seleção de proteína 2,4-diclorofenoxiacetato monoxigenase), metotrexato (para uma seleção de proteína diidrofolato reductase insensível a metotrexato), ou aminoetilcisteína (para uma seleção de proteína octopina sintase insensível à aminoetilcisteína). Um gene marcador selecionável preferido é um gene de EPSPS de CP4 que confere resistência ao glifosato herbicida. O gene de marcador classificável pode ser um gene que codifica uma proteína beta-glicuronidase, uma proteína verde fluorescente, uma proteína amarela fluorescente, uma proteína beta-galactosidase, uma proteína luciferase derivada de um gene luc, uma proteína de luciferase derivada de um gene lux, uma proteína sialidase, proteína de estreptomicina fosfotransferase, uma proteína de nopalina sintase, uma proteína de octopina sintase ou uma proteína cloranfenicol acetil transferase.

As moléculas de ácido nucléico descritas acima são modalidades que alcançam os objetivos, características e vantagens da presente invenção. Não é pretendido que a presente invenção fique limitada às modalidades ilustradas. A disposição das seqüências nos primeiro e segundo grupo D de seqüências de DNA na molécula de ácido nucléico não é limitada às disposições ilustradas e descritas, e pode ser alterada de qualquer maneira adequada para alcançar os objetivos, características e vantagens da presente invenção como descrito aqui e ilustrado nos desenhos acompanhantes.

B. Organismos Transgênicos, e Métodos para Produzir o Mesmo

Quaisquer das moléculas de ácido nucléico e constructos da invenção podem ser introduzidas em uma planta de soja ou célula de planta de uma maneira permanente ou transiória. Os métodos e tecnologia para introdução de DNA em células de planta de soja são bem conhecidas por aqueles de experiência na técnica, e virtualmente qualquer método pelo qual

moléculas de ácido nucléico podem ser introduzidas em uma célula é adequado para uso na presente invenção. Os exemplos não limitantes de métodos adequados incluem: métodos químicos; métodos físicos tal como microinjection, eletroporação, a pistola de gene, bombardeio de microprojétil, e infiltração a vácuo; vetores virais; e mecanismos mediados por receptor. Outros métodos de transformação de célula também podem ser usados e podem ser incluídos porém não estão limitados a introdução de DNA em plantas através de transferência de DNA direta em pólen, por injeção direta de DNA em órgãos reprodutivos de uma planta, ou por injeção direta de DNA nas células de embriões imaturos seguido pela reidratação de embriões dessecados.

A transferência mediada por *Agrobactéria* é um sistema extensamente aplicável para introduzir genes em células de planta. Veja, por exemplo, Fraley e outros, *Bio/Technology* 3:629-635 (1985); Rogers e outros, *Methods Enzymol.* 153:253-277 (1987). A região de DNA a ser transferida é definida pelas seqüências fronteiras e o DNA interveniente é normalmente inserido no genoma de planta. Spielmann e outros, *Mol. Gen. Genet.* 205:34 (1986). Os novos vetores de transformação de *Agrobactéria* são capazes de réplica em *E. coli* como também *Agrobactéria*, permitindo manipulações convenientes. Klee e outros, *Em: Plant DNA Infectious Agents*, Hohn e Schell (eds.), Springer-Verlag, Nova Iorque, pp. 179-203 (1985). A transformação mediada por *Agrobactéria* de soja especificamente é descrita na Patente U.S. No. 7.002.058.

As plantas transgênicas são obtidas tipicamente ligando-se o gene de interesse (isto é, neste caso um transgene que diminui a expressão de um gene FAD2-1 de soja endógena ou que diminui a expressão tanto de um gene FAD2-1 quanto gene FATB) a um gene marcador selecionável, introduzindo os transgenes ligados em uma célula de planta, um tecido de planta ou uma planta antes de qualquer um dos métodos descritos acima, e regenerando ou de outro modo recuperando a planta transgênica sob condições que requerem expressão do referido gene marcador selecionável para crescimento de planta. Os genes marcadores selecionáveis exemplares

e os agentes seletivos correspondentes foram descritos em seções anteriores desta descrição da invenção.

As plantas transgênicas também podem ser obtidas ligando-se um gene de interesse (isto é, neste caso um transgene que diminui expressão de um gene FAD2-1 de soja endógena ou que diminui a expressão de ambos um gene FAD2-1 ou gene FATB) a um gene marcador classificável, introduzindo os transgenes ligados em uma célula de planta antes de qualquer um dos métodos descritos acima, e regenerando as plantas transgênicas de células de planta transformadas que testam positivo para expressão do gene marcador classificável. Os genes marcadores classificáveis exemplares foram descritos em seções anteriores desta descrição da invenção.

A regeneração, desenvolvimento e cultivo de plantas de transformantes de protoplasto de planta única ou de vários explantes transformados, são bem-conhecidos na técnica. Geralmente veja, Maliga e outros, *Methods in Plant Biology Molecular*, Cold Spring Harbor Press (1995); Weissbach and Weissbach, In: *Methods for Plant Biology Molecular*, Academic Press, San Diego, CA (1988). As plantas da presente invenção podem ser parte de ou podem ser geradas de um programa de reprodução, e podem ser reproduzidas também usando apomixia. Os métodos para a produção de plantas apomíticas são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Patente U.S. 5.811.636.

Um método particular de obter plantas de soja pouco linolênicas/meio oléicas contemplado aqui requer a transformação direta de variedades de soja que compreendem pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena com um transgene que diminui a expressão de um gene FAD2-1 de soja endógena. Os exemplos de variedades de soja que compreendem pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena incluem A5, C1640, 6P248, N98-44, T27111, T27190, T26767, T26830, e soja de Soyola® (veja Pedido de Patente U.S. 20060107348 e Burton e outros, *Crop Sci.* 44:687-688, 2004). Também é contemplado que outras linhagens de soja que

compreendem pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena e que possuem crescimento agronomicamente elite e/ou produzem características produzidas pelos métodos de reprodução ajudados pelo marcador descritos em, veja Pedido de Patente U.S. 20060107348 poderiam ser transformadas diretamente com um transgene que diminui a expressão de um gene FAD2-1 de soja endógena. Alternativamente, também é contemplado que as linhagens de soja que compreendem pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena e que são sensíveis à transformação podem ser produzidas pelos métodos de reprodução ajudados pelo marcador descritos em, veja Pedido de Patente U.S. No. 11/239.676. As plantas de soja compreendendo pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena e que são sensíveis à transformação também podem ser transformadas diretamente com um transgene que diminui a expressão de um gene FAD2-1 de soja endógena. Três outras sojas pouco linolênicas que poderiam ser transformadas diretamente pelos métodos da invenção incluem BARC12 que é uma linhagem No. 3 de grupo de maturidade determinante, linhagens de soja Vistive® (Monsanto, St.Louis, MO., USA), ou 0137648/01AHKW-38, que é uma linhagem hilum amarelo L2 NUL.

Também é contemplado que as plantas de soja pouco linolênicas que são transformadas diretamente com o transgene nos métodos da invenção podem ser derivadas de germplasma de soja que compreende regiões genômicas de planta de soja que contêm fad3-1b -, fad3-1c-, ou ambos os alelos fad3-1b- e fad3-1c - que conferem conteúdo de ácido linolênico diminuído. Tais polimorfismos de nucleotídeo único associados com o fenótipo de soja pouco linolênico são descritos no Pedido de Patente U.S. No. 11/239.676. Em certas modalidades, uma região genômica de soja que confere o fenótipo de baixo teor de ácido linolênico é caracterizada por um polimorfismo de nucleotídeo único em uma posição na sequência de gene FAD3-1B que corresponde ao nucleotídeo 2021 de SEQ ID NO:61. Em outra modalidade, a região genômica de soja que confere o

fenótipo de baixo teor de ácido linolênico, é caracterizada por um polimorfismo de nucleotídeo único em uma posição na sequência de gene FAD3-1C que corresponde ao nucleotídeo 687, 1129, 1203, 2316, 3292, 3360 ou 3743 de SEQ ID NO:62. Em outra modalidade, a região genômica de soja que confere o fenótipo de baixo teor de ácido linolênico é caracterizada por um polimorfismo de nucleotídeo único em uma posição no promotor de FAD3-1C que corresponde ao nucleotídeo 334, 364, 385, 387, 393, 729 ou 747 de SEQ ID NO:63. Em outra modalidade, a região genômica de soja que confere o fenótipo de baixo teor de ácido linolênico é caracterizada por uma deleção no gene FAD3-1C. As regiões genômicas de soja que conferem o fenótipo de baixo teor de ácido linolênico também podem ser caracterizadas por ambos um polimorfismo de nucleotídeo único em uma posição na sequência de gene FAD3-1B que corresponde ao nucleotídeo 2021 de SEQ ID NO:61 e uma deleção na sequência de gene FAD3-1c. As regiões genômicas de soja que conferem o fenótipo de baixo teor de ácido linolênico também podem ser caracterizadas por ambos um polimorfismo de nucleotídeo único em uma posição na sequência de gene FAD3-1B que corresponde ao nucleotídeo 2021 da SEQ ID NO:61 e um polimorfismo no promotor de FAD3-1C, tal como um polimorfismo de nucleotídeo único em uma posição que corresponde ao nucleotídeo 334, 364, 385, 387, 393, 729 ou 747 de SEQ ID NO:63. Germplasma de soja que compreende uma deleção no gene de soja de FAD3-1C é útil na prática destes métodos e pode ser obtido de linhagens de soja que incluem porém não são limitadas às linhagens de soja 6P248, T27111, T27190, T26767, T26830 e A5, descritas no Pedido de Patente U.S. No. 11/239.676.

A detecção dos polimorfismos de nucleotídeo único pode ser realizada por qualquer método, incluindo PCR, análise de polimorfismo conformacional de filamento único, eletroforese de gel de gradiente de desnaturação, análise de polimorfismo de fragmento de comprimento de clivagem e/ou seqüenciamento de DNA como descrito no Pedido de Patente U.S. No. 11/239.676. Alternativamente, o polimorfismo de nucleotídeo único pode ser detectado por qualquer ensaio que seja selecionado do grupo que

consiste em extensão de base única (SBE), seqüenciamento de extensão de iniciador específico de alelo (ASPE), seqüenciamento, PCR universal, extensão específica de alelo, hibridização, espectrometria de massa, ligação, ligação por extensão, e ensaios mediados por Flap Endonuclease.

- 5 Os iniciadores e métodos para detecção dos polimorfismos genéticos FAD3-1B e FAD3-1C acima mencionados são descritos no Pedido de Patente U.S. No. 11/239.676. As deleções tal como aquelas no gene FAD3-1C podem ser detectadas por métodos que incluem porém não estão limitados à PCR, hibridização, análise de polimorfismo de fragmento de comprimento de
- 10 clivagem e/ou os métodos com base em seqüenciamento de DNA.

- Os métodos de transformação diretas como descrito acima também podem ser usados para obter plantas de soja pouco linolênicas/pouco saturadas/meio oléicas. Nestes métodos, as plantas de soja pouco linolênicas acima mencionadas são transformadas diretamente
- 15 com transgenes que diminuem a expressão tanto de um gene FAD2-1 de soja endógena quanto um gene FATB de soja endógena para produção de plantas de soja com um fenótipo de ácido pouco linolênico, pouco saturado, meio oléico.

- Os transgenes que podem ser usados na transformação ou
- 20 transfecção de planta podem ser quaisquer dos transgenes que diminuem a expressão de qualquer um: 1) o gene(s) FAD2- 1 de soja endógena ou 2) ambos gene(s) FAD2-1 e FATB de soja endógena. É contemplado também que vetores que compreendem transgenes que diminuem a expressão de qualquer um: 1) o gene(s) FAD2-1 de soja endógena ou 2) ambos os genes
- 25 FAD2-1 e FATB de soja endógena também podem compreender ou ser geneticamente combinados com transgenes adicionais. Por exemplo, os transgenes adicionais que expressam outros genes que afetam a composição de óleo, resistência de patógeno, produção, morfologia, composição de proteína, composição de aminoácido, composição de amido,
- 30 e nível de fitato são descritos no Pedido de Patente U.S. No. 11/239.676 e podem ser combinados com os transgenes e mutantes poucos linolênicos descritos aqui.

Não é pretendido que a presente invenção seja limitada às modalidades ilustradas. As moléculas de ácido nucléico exemplares foram descritas na parte A da Descrição Detalhada, e moléculas de ácido nucléico exemplares não-limitantes também são descritas e ilustradas abaixo nas

5 Figuras 1-4, e nos Exemplos.

C. Cruzamentos de Plantas de Soja que Contêm Transgenes

Em outro aspecto, uma planta da invenção pode ser cruzada com outra planta que seja transgênica ou não-transgênica. Uma planta pode ser cruzada com outra planta que tenha uma composição de óleo que

10 contém níveis modificados de ácidos graxos, por exemplo sem limitação, uma variedade com uma composição de óleo que tem um nível de ácido linolênico mais baixo. Em uma modalidade preferida, uma planta da presente invenção é cruzada com uma variedade com menos do que 3% em peso de ácido linolênico. Em outra modalidade da invenção, uma planta da presente

15 invenção é cruzada com outra planta que tem mais do que 20% em peso do ácido esteárico. Tal planta, tendo níveis modificados de ácidos graxos, é conhecida e descrita na técnica, por exemplo, em Hawkins e Kridl (1998) Plant Journal 13(6):743-752 e Patente U.S. No. 6.365.802.

Em particular, os cruzamentos de plantas de soja que

20 compreendem um transgene qualquer que diminua a expressão de um gene FAD2-1 de soja endógena ou diminua a expressão de ambos os genes FAD2-1 e FATB de soja endógena com variedades de soja que compreendem pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena, são contemplados pelos métodos desta invenção.

25 Os exemplos de variedades de soja que compreendem pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena incluem A5, C1640, 6P248, N98-44, T27111, T27190, T26767, T26830, e soja de Soyola[®] (veja Pedido de Patente U.S. 20060107348 e Burton e outros, Crop Sci. 44:687-688, 2004). Também é contemplado que outras linhagens de

30 soja que compreendem pelo menos uma mutação de perda de função em um gene FAD3 de soja endógena e que possuem crescimento agronomicamente elite e/ou produzem características produzidas pelos

métodos de reprodução ajudados pelo marcador descritos em, veja Pedido de Patente U.S. 20060107348 poderiam ser cruzadas com plantas de soja que compreendem um transgene que diminui a expressão de um gene FAD2-1 de soja endógena. Três outros pares de cruzamento pouco
5 linolênico que poderiam ser usados nos métodos da invenção incluem BARC12 que é uma linhagem No. 3 de grupo de maturidade determinante, linhagem de soja Vistive®, ou 0137648/01AHKW-38, que é uma linhagem hilum amarelo L2 NUL.

Também é contemplado que as plantas de soja pouco linolênica
10 usadas no cruzamento com o transgene(s) podem ser derivadas de germplasma de soja que compreende regiões genômicas de planta de soja que contêm fad3-1b -, fad3-1c-, ou ambos alelos fad3-1b- e fad3-1c- que conferem teor de ácido linolênico diminuído. Tais polimorfismos de nucleotídeo único, associados com o fenótipo de soja pouco linolênico são
15 descritos no Pedido de Patente U.S. No. 11/239.676. Em certas modalidades, uma região genômica de soja que confere o fenótipo de baixo teor de ácido linolênico é caracterizada por um polimorfismo de nucleotídeo único em uma posição na seqüência de gene FAD3-1B que corresponde ao nucleotídeo 2021 de SEQ ID NO:61. Em outra modalidade, a região
20 genômica de soja que confere o fenótipo de baixo teor de ácido linolênico é caracterizada por um polimorfismo de nucleotídeo único em uma posição na seqüência de gene FAD3-1C que corresponde ao nucleotídeo 687, 1129, 1203, 2316, 3292, 3360 ou 3743 de SEQ ID NO:62. Em outra modalidade, a região genômica de soja que confere o fenótipo de baixo teor de ácido
25 linolênico é caracterizada por um polimorfismo de nucleotídeo único em uma posição no promotor de FAD3-1C que corresponde ao nucleotídeo 334, 364, 385, 387, 393, 729 ou 747 de SEQ ID NO:63. Em outra modalidade, a região genômica de soja que confere o fenótipo de baixo teor de ácido linolênico é caracterizada por uma deleção no gene FAD3-1C. As regiões genômicas de
30 soja que conferem o fenótipo de baixo teor de ácido linolênico também podem ser caracterizadas por ambos um polimorfismo de nucleotídeo único em uma posição na seqüência de gene FAD3 -1B que corresponde ao

nucleotídeo 2021 de SEQ ID NO:61 e uma deleção na sequência de gene FAD3-1C. As regiões genômicas de soja que conferem o fenótipo de baixo teor de ácido linolênico também podem ser caracterizadas por ambos um polimorfismo de nucleotídeo único em uma posição na sequência de gene

5 FAD3-1B que corresponde ao nucleotídeo 2021 de SEQ ID NO:61 e um polimorfismo no promotor de FAD3-1C, como um polimorfismo de nucleotídeo único em uma posição que corresponde ao nucleotídeo 334, 364, 385, 387, 393, 729 ou 747 de SEQ ID NO:63. Germplasma de soja que compreende uma deleção no gene FAD3-1C de soja é útil na prática destes

10 métodos e pode ser obtido de linhagens de soja que incluem porém não estão limitadas à linhagem de soja 6P248, T27111, T27190, T26767, T26830 e A5, descrita no Pedido de Patente U.S. No. 11/239.676. As Tabelas 3 e 4 dos Exemplos descrevem a associação de polimorfismos específicos com germplasma de soja específico ou linhagens de soja que

15 exibem fenótipos de ácido pouco linolênico.

Sem estar limitado por teoria, é também notado que certos polimorfismos e deleções em certos genes FAD3-1C são potencialmente em parte responsáveis pelos fenótipos de ácidos pouco linolênicos exibidos por plantas de soja que carregam estes polimorfismos ou deleções. O SNP na

20 2021 posição em SEQ ID NO:61 é uma mutação de sentido que muda um resíduo de aminoácido de Histidina para Tirosina. O resíduo de histidina foi constatado ser crítico em vários genes envolvidos com a dessaturação. Constatou-se que este SNP particular causou uma mutação no motivo His-Val-Ile-His-His a His-Val-Ile-His-Tyr nas linhagens pouco linolênicas. O motif

25 foi associado com um fenótipo pouco linolênico e é uma causa provável para o fenótipo de ácido linolênico reduzido observado em sojas com este polimorfismo.

A detecção do polimorfismo de nucleotídeo único pode ser realizada por qualquer método, incluindo PCR, análise de polimorfismo

30 conformacional de filamento único, eletroforese de gel de gradiente de desnaturação, análise de polimorfismo de fragmento de comprimento de clivagem e/ou seqüenciamento de DNA como descrito no Pedido de Patente

U.S. No. 11/239.676. Alternativamente, o polimorfismo de nucleotídeo único pode ser detectado por qualquer ensaio que seja selecionado do grupo que consiste em extensão de base única (SBE), seqüenciamento de extensão de iniciador específico de alelo (ASPE), seqüenciamento, PCR universal, 5 extensão específica de alelo, hibridização, espectrometria de massa, ligação, ligação por extensão, e ensaios mediados por Flap Endonuclease. Iniciadores e métodos para detecção dos polimorfismos genéticos de FAD3-1B e FAD3-1C acima mencionados são descritos no Pedido de Patente U.S. No. 11/239.676. As deleções tal como aquelas no gene FAD3-1C podem ser 10 detectadas por métodos que incluem porém não podem ser limitados à PCR, hibridização, análise de polimorfismo de fragmento de comprimento de clivagem e/ou métodos com base em seqüenciamento de DNA.

Os métodos de cruzamento como descrito acima também podem ser usados para obter planta de soja pouco linolênicas/pouco 15 saturadas/meio oléicas. Nestes métodos, as plantas de soja pouco linolênicas, acima mencionadas são cruzadas com plantas de soja que compreendem transgenes que diminuem a expressão de ambos um gene FAD2-1 de soja endógena e um gene FATB de soja endógena para produção de plantas de soja com um fenótipo de ácido pouco linolênico, 20 pouco saturado, meio oléico.

É contemplado também que os cruzamentos do transgene(s) com as linhagens de soja pouco linolênicas, podem ser facilitados por acoplamento de um marcador selecionável que confere resistência a um herbicida. Por exemplo, em cruzamentos de plantas de soja que são 25 heterozigoto para o transgene com plantas que são homozigoto ou heterozigoto para o alelo(s) conferindo a característica de pouco linolênico, progênie de F1 que é heterozigoto para o transgene pode ser selecionada através de tratamento de herbicida. Também, as plantas F2 derivadas de plantas F1 que são heterozigoto para o transgene podem ser enriquecidas 30 para planta de soja F2 que são homozigoto para referido transgene submetendo-se a referida pluralidade de plantas F2 à seleção de herbicida para o transgene. Os marcadores moleculares que podem distinguir plantas

de soja que são heterozigoto ou homozigoto para o transgene também podem ser usados para identificar plantas de soja que são homozigoto para a inserção de transgene.

As plantas de soja (*Glycine max* L.) podem ser cruzadas através de qualquer técnica natural ou mecânica. A polinização natural ocorre em sojas ou por polinização propriamente dita ou polinização cruzada natural, que tipicamente é ajudada pela polinização dos organismos. Em cruzamentos naturais ou artificiais, florescência e tempo de florescência são uma consideração importante. A soja é uma planta de dia curto, porém há variação genética considerável quanto à sensibilidade ao fotoperíodo. A duração de dia crítico para florescer varia de cerca de 13 h para genótipos adaptados a latitudes tropicais a 24 h para genótipos insensíveis a fotoperíodo crescidos em latitudes mais altas. As sojas parecem ser insensíveis à duração do dia por 9 dias após a emergência. Os fotoperíodos mais curtos que o comprimento de dia crítico são requeridos durante 7 a 26 dias para completar a indução de flor.

As flores da soja tipicamente são autopolinizadas no dia que a corola abre. O estigma é receptivo ao pólen cerca de 1 dia antes da antese e permanece receptivo durante 2 dias após antese, se as pétalas de flor não forem removidas. Os filamentos de nove estames são fundidos, e o mais próximo do padrão é livre. Os estames formam um anel abaixo do estigma até cerca de 1 dia antes da antese, então os seus filamentos começam a se prolongar rapidamente e elevar as anteras ao redor do estigma. As anteras descem no dia da antese, os grãos de pólen caem no estigma, e dentro de 10 h os tubos de pólen alcançam o ovário e a fertilização é completada. A autopolinização ocorre naturalmente em soja sem manipulação das flores. Para o cruzamento de duas plantas de soja, é tipicamente preferível, embora não exigido, utilizar hibridização artificial. Na hibridização artificial, a flor usada como uma fêmea em um cruzamento é manualmente polinizada cruzada antes da maturação de pólen da flor, desse modo prevenindo a auto-fertilização, ou alternativamente, as partes masculinas da flor são castradas usando uma técnica conhecida na técnica. As técnicas para

castrar as partes masculinas de uma flor de soja incluem, por exemplo, remoção física das partes masculinas, uso de um fator genético que confere esterilidade masculina, e aplicação de uma gametocida química às partes masculinas.

- 5 Ou com ou sem emasculação da flor feminina, a polinização manual pode ser realizada removendo os estames e pistilo com um fórceps de uma flor origem masculino e escovando as anteras suavemente contra o estigma da flor feminina. O acesso para os estames pode ser alcançado removendo a sépala dianteira e pétalas de quilha, ou perfurando a quilha
- 10 com fórceps fechado e os permitindo-a abrir para empurrar as pétalas. A escovação das anteras no estigma faz com que ele rompe, e a porcentagem mais alta de cruzamentos prósperos é obtida quando pólen é claramente visível no estigma. O pólen caído pode ser verificado batendo as anteras antes de escovar o estigma. Várias flores masculinas podem ter que ser
- 15 usadas para obter pólen adequado caído quando as condições são desfavoráveis, ou o mesmo macho pode ser usado para polinizar várias flores com bom pólen caído.

- A esterilidade masculina genética está disponível em sojas e pode ser útil para facilitar a hibridização no contexto da invenção atual,
- 20 particularmente para programas de seleção periódica. A distância requerida para isolamento completo de um bloco de cruzamento não está clara; porém, a herança de material genético é menor do que 0,5% quando plantas macho-estéreis forem 12 m ou mais de uma fonte de pólen estrangeira (Boerma e Moradshahi, Crop Sci., 15:858-861, 1975). As plantas nos limites
- 25 de um bloco de cruzamento provavelmente sustentam a maior parte da herança de material genético com pólen estrangeiro e podem ser eliminadas na colheita para minimizar contaminação.

- Uma vez colhidas, as vagens são tipicamente secadas a ar em não mais do que 38°C até que as sementes contenham 13% de umidade ou
- 30 menos, então as sementes são removidas manualmente. A semente pode ser armazenada adequadamente em cerca de 25°C durante até um ano se a umidade relativa for 50% ou menos. Em climas úmidos, a porcentagem de

germinação declina rapidamente, a menos que a semente seja secada a 7% de umidade e armazenada em um recipiente hermético em temperatura ambiente. O armazenamento em longo prazo em qualquer clima é melhor realizado secando a semente a 7% de umidade e armazenando em 10°C ou
5 menos em um ambiente mantido a 50% de umidade relativa ou em um recipiente hermético.

F. Produtos da Presente invenção

As plantas da presente invenção podem ser usadas em todo ou em parte. As partes de planta preferidas incluem partes reprodutoras ou de
10 armazenamento. O termo "partes de planta" como usado aqui inclui, sem limitação, semente, endosperma, óvulo, pólen, raízes, tubérculos, talos, folhas, talos, fruta, bagas, nozes, cascas, vagens, sementes e flores. Em uma modalidade particularmente preferida da presente invenção a parte de planta é uma semente.

15 Quaisquer das plantas ou partes desta da presente invenção pode ser processada para produzir um alimento, refeição, proteína, ou preparação de óleo. Uma parte de planta particularmente preferida para este propósito é uma semente. Em uma modalidade preferida o alimento, refeição, proteína ou preparação de óleo é designada para animais de gado,
20 peixes ou humanos, ou qualquer combinação. Métodos para produzir alimento, refeição, proteína e preparações de óleo são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Patentes U.S. 4.957.748. 5.100.679. 5.219.596. 5.936.069. 6.005.076. 6.146.669. e 6.156.227. Em uma modalidade preferida, a preparação de proteína é uma preparação de alto teor de
25 proteína. Uma tal preparação de alto teor de proteína tem um conteúdo de proteína preferivelmente maior do que 5% em peso/volume, mais preferivelmente 10% em peso/volume, e até mesmo mais preferivelmente 15% em peso/volume.

Em uma preparação de óleo preferida, a preparação de óleo é
30 uma preparação com alto teor de óleo com um conteúdo de óleo derivado de uma planta ou parte desta da presente invenção maior do que 5% em peso/volume, mais preferivelmente 10% em peso/volume, e até mesmo mais

preferivelmente 15% em peso/volume. Em uma modalidade preferida a preparação de óleo é um líquido e de um volume maior que 1, 5, 10 ou 50 litros. A presente invenção fornece óleo produzido de plantas da presente invenção ou gerado por um método da presente invenção. Tal óleo pode
5 exibir estabilidade oxidativa aumentada. Também, tal óleo pode ser um componente secundário ou principal de qualquer produto resultante.

Além disso, tal óleo pode ser misturado com outros óleos. Em uma modalidade preferida, o óleo produzido de plantas da presente invenção ou gerado por um método da presente invenção constitui mais do
10 que 0,5%, 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% ou 90% em volume ou peso do componente de óleo de qualquer produto. Em outra modalidade, a preparação de óleo pode ser misturada e pode constituir mais do que 10%, 25%, 35%, 50% ou 75% da mistura em volume. O óleo produzido de uma planta da presente invenção pode ser misturado com um ou mais solventes
15 orgânicos ou destilados de petróleo.

As sementes das plantas podem ser colocadas em um recipiente. Como usado aqui, um recipiente é qualquer objeto capaz de guardar tal semente. Um recipiente contém mais do que cerca de 500, 1,000, 5,000, ou 25,000 sementes preferivelmente onde pelo menos cerca
20 de 10%, 25%, 50%, 75% ou 100% das sementes são derivados de uma planta da presente invenção. A presente invenção também fornece um recipiente de mais do que cerca de 10.000, mais preferivelmente cerca de 20.000, e até mesmo mais preferivelmente cerca de 40.000 sementes onde mais do que cerca de 10%, mais preferivelmente cerca de 25%, mais
25 preferivelmente 50% e até mesmo mais preferivelmente cerca de 75% ou 90% das sementes são sementes derivadas de uma planta da presente invenção. A presente invenção também fornece um recipiente de mais do que cerca de 10 kg, mais preferivelmente cerca de 25 kg, e até mesmo mais preferivelmente cerca de 50 kg de sementes onde mais do que cerca de
30 10%, mais preferivelmente cerca de 25%, mais preferivelmente cerca de 50% e até mesmo mais preferivelmente cerca de 75% ou 90% das sementes são sementes derivadas de uma planta da presente invenção.

As sementes de soja produzidas pelos métodos da invenção podem compreender várias composições de óleo. Um óleo produzido por sementes de soja produzidas pelos métodos da invenção é referido abaixo como um "óleo da presente invenção".

5 Um óleo preferido da presente invenção tem uma composição de óleo pouco saturada, ou uma composição de óleo zero saturada. Em outras modalidades preferidas, os óleos da presente invenção aumentaram os níveis de ácido oléico, reduziram os níveis de ácido graxo saturado, e reduziram os níveis de ácido graxo poliinsaturado. Em modalidades
10 preferidas adicionais, os óleos da presente invenção aumentaram os níveis de ácido oléico e reduziram os níveis de ácido graxo saturado. Em uma modalidade preferida, o óleo é um óleo de soja. As porcentagens de conteúdo de ácido graxo, ou níveis de ácido graxo, usados aqui se referem às porcentagens em peso.

15 Em uma primeira modalidade, um óleo da presente invenção tem uma composição de óleo que é 55 a 80% de ácido oléico, cerca de 12 a 43% de poliinsaturados, preferivelmente e 2 a 8% de ácidos graxos saturados; mais preferivelmente tem uma composição de óleo que é 55 a 80% de ácido oléico, cerca de 14 a 42% de poliinsaturados, e 3 a 6% de
20 ácidos graxos saturados; e até mesmo mais preferivelmente tem uma composição de óleo que é 55 a 80% de ácido oléico, cerca de 16,5 a 43% de poliinsaturados, e 2 a 3,6% de ácidos graxos saturados.

Em uma segunda modalidade, um óleo da presente invenção tem uma composição de óleo que é 65 a 80% de ácido oléico, cerca de 12 a
25 33% de poliinsaturados, preferivelmente e 2 a 8% de ácidos graxos saturados; mais preferivelmente tem uma composição de óleo que é 65 a 80% de ácido oléico, cerca de 14 a 32% de poliinsaturados, e 3 a 6% de ácidos graxos saturados; e até mesmo mais preferivelmente tem uma composição de óleo que é 65 a 80% de ácido oléico, cerca de 16,5 a 33% de
30 poliinsaturados, e 2 a 3,6% de ácidos graxos saturados.

Em uma terceira modalidade, um óleo da presente invenção preferivelmente tem uma composição de óleo que é cerca de 42 a cerca de

85% de ácido oléico e cerca de 8% a cerca de 1,5% de ácidos graxos saturados.

Em uma quarta modalidade, um óleo da presente invenção tem uma composição de óleo que é cerca de 42 a cerca de 85% de ácido oléico, cerca de 8% a cerca de 1,5% de ácidos graxos saturados, cerca de 6% a cerca de 15% em peso de ácido linolênico; mais preferivelmente tem uma composição de óleo que é cerca de 42 a cerca de 85% de ácido oléico, cerca de 8% a cerca de 1,5% de ácidos graxos saturados, menos do que 35% em peso de ácido linolênico; e até mesmo mais preferivelmente tem uma composição de óleo que é cerca de 42 a cerca de 85% de ácido oléico, cerca de 8% a cerca de 1,5% de ácidos graxos saturados, cerca de 9% em peso de ácido linolênico.

Em uma quinta modalidade, um óleo da presente invenção tem uma composição de óleo que é cerca de 50% a cerca de 85% de ácido oléico e cerca de 8% a cerca de 1,5% de ácidos graxos saturados; mais preferivelmente cerca de 50% a cerca de 85% de ácido oléico, cerca de 8% a cerca de 1,5% de ácidos graxos saturados, cerca de 4% a cerca de 14% em peso de ácido linolênico; mais preferivelmente tem uma composição de óleo que é cerca de 50% a cerca de 85% de ácido oléico, cerca de 8% a cerca de 1,5% de ácidos graxos saturados, menos do que 35% em peso de ácido linolênico; e até mesmo mais preferivelmente tem uma composição de óleo que é cerca de 42 a cerca de 85% de ácido oléico, cerca de 8% a cerca de 1,5% de ácidos graxos saturados, cerca de 2% a cerca de 45% em peso de ácido linolênico.

Em outra modalidade, um óleo da presente invenção tem uma composição de óleo que é cerca de 65-80% de ácido oléico, cerca de 3-8% de saturados, e cerca de 12-32% de poliinsaturados. Em outra modalidade, um óleo da presente invenção tem uma composição de óleo que é cerca de 65-80% de ácido oléico, cerca de 2-3,5% de saturados, e cerca de 16,5-33% de poliinsaturados.

Em uma modalidade particularmente preferida, um óleo da presente invenção tem uma composição de óleo que é cerca de 47-83% de

- ácido oléico e cerca de 5% de saturados; cerca de 60-80% de ácido oléico e cerca de 5% de saturados; cerca de 50-85% de ácido oléico e cerca de 2-7% de saturados; cerca de 55-85% de ácido oléico e cerca de 2,5-7% de saturados; cerca de 47-88% de ácido oléico e cerca de 3-7% de saturados;
- 5 cerca de 43-85% de ácido oléico e cerca de 5-7% de saturados; cerca de 81-85% de ácido oléico e cerca de 5% de saturados; cerca de 74-83% de ácido oléico e cerca de 6% de saturados; cerca de 65-87% de ácido oléico e cerca de 6% de saturados; cerca de 66-80% de ácido oléico e cerca de 6% de saturados; cerca de 42-77% de ácido oléico e cerca de 5-8% de saturados;
- 10 cerca de 60-77% de ácido oléico e cerca de 6% de saturados; cerca de 70-81% de ácido oléico e cerca de 5-7% de saturados; cerca de 52-71% de ácido oléico e cerca de 5-7% de saturados; cerca de 44-71% de ácido oléico e cerca de 6% de saturados; cerca de 61-71% de ácido oléico e cerca de 8% de saturados; cerca de 57-71% de ácido oléico e cerca de 7% de saturados;
- 15 cerca de 23-58% de ácido oléico e cerca de 8-14% de saturados; cerca de 20-70% de ácido oléico e cerca de 6% de saturados; cerca de 21-35% de ácido oléico e cerca de 5-6% de saturados; ou cerca de 19-28% de ácido oléico e cerca de 5% de saturados.

- Em outras modalidades, a porcentagem de ácido oléico é 50%
- 20 ou maior; 55% ou maior; 60% ou maior; 65% ou maior; 70% ou maior; 75% ou maior; ou 80% ou maior; ou é uma faixa de 50 a 80%; 55 a 80%; 55 a 75%; 55 a 65%; 60 a 85%; 60 a 80%; 60 a 75%; 60 a 70%; 65 a 85%; 65 a 80%; 65 a 75%; 65 a 70%; ou 69 a 73%. As faixas de porcentagem adequadas para o conteúdo de ácido oléico em óleos da presente invenção
- 25 também incluem faixas nas quais o limite mais baixo é selecionado das seguintes porcentagens: 50, 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, ou 80 por cento; e o limite superior é selecionado das seguintes porcentagens: 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83,
- 30 84, 85, 86, 87, 88, 89, ou 90 por cento.

Em outras modalidades, a porcentagem de ácido linolênico em um óleo da presente invenção é 10% ou menos; 9% ou menos; 8% ou

menos; 7% ou menos; 6% ou menos; 5% ou menos; 4,5% ou menos; 4% ou menos; 3,5% ou menos; 3% ou menos; 3,0% ou menos; 2,5% ou menos; ou 2% ou menos; ou é uma faixa de 0,5 a 2%; 0,5 a 3%; 0,5 a 4,5%; 0,5% a 6%; 3 a 5%; 3 a 6%; 3 a 8%; 1 a 2%; 1 a 3%; ou 1 a 4%.

- 5 Nestas outras modalidades, a porcentagem de ácidos graxos saturados em uma composição de óleo da presente invenção é 15% ou menos; 14% ou menos; 13% ou menos; 12% ou menos; 11% ou menos; 10% ou menos; 9% ou menos; 8% ou menos; 7% ou menos; 6% ou menos; 5% ou menos; 4% ou menos; ou 3,6% ou menos; ou é uma faixa de 2 a 3%;
 10 2 a 3,6%; 2 a 4%; 2 a 8%; 3 a 15%; 3 a 10%; 3 a 8%; 3 a 6%; 3,6 a 7%; 5 a 8%; 7 a 10%; ou 10 a 15%.

- Em outras modalidades, os ácidos graxos saturados em um óleo da presente invenção incluem a combinação dos ácidos graxos esteáricos e palmíticos. Em uma modalidade, a porcentagem de ácidos graxos saturados
 15 varia de cerca de 10% ou menos; cerca de 9% ou menos; cerca de 8% ou menos; cerca de 7% ou menos; cerca de 6% ou menos; cerca de 5% ou menos; cerca de 4,5% ou menos; cerca de 4% ou menos; cerca de 3,5% ou menos; cerca de 3% ou menos; cerca de 3,0% ou menos; cerca de 2,5% ou menos; ou cerca de 2% ou menos; ou é uma faixa de 0,5 a 2%; 0,5 a 3%;
 20 0,5 a 4,5%; 0,5 a 6%; 0,5 a 7%; 0,5 a 8%; 0,5 a 9%; 1 a 4%; 1 a 5%; 1 a 6%; 1 a 7%; 1 a 8%; 1 a 9%; 1,5 a 5%; 1,5 a 6%; 1,5 a 7%; 1,5 a 8%; 1,5 a 9%; 2 a 5%; 2 a 6%; 2 a 7%; 2 a 8%; 2 a 9%; 3 a 5%; 3 a 6%; 3 a 7%; 3 a 8%; 3 a 9%; 4 a 7%; 4 a 8%; 4 a 9%; 5 a 7%; 5 a 8%; e 5 a 9%. Nestas modalidades, as faixas de porcentagem adequadas para conteúdo de ácido graxo
 25 saturado em óleos da presente invenção também incluem faixas nas quais o limite mais baixo é selecionado das seguintes porcentagens: 0,5, 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, ou 6,5 por cento; e o limite superior é selecionado das seguintes porcentagens: 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5, 1, ou 0,5 por cento.

30 G. Modulação de Supressão

Outra modalidade da invenção é voltada a um método para modular níveis de supressão de gene. A modulação de supressão de gene

pode resultar em mais ou menos supressão de gene. A supressão de um produto de gene pode ser o resultado de inserção de um constructo da presente invenção em um genoma de planta. Semelhantemente, a modulação de supressão de gene pode ser o resultado de inserção de um constructo da presente invenção em um genoma de planta. Outros exemplos de métodos para modular supressão de gene incluem, sem limitação, técnicas de anti-sentido, co-supressão, interferência de RNA (dsRNAi), animais transgênicos, híbridos, e ribozimas que usam uma construção da presente invenção. Os seguintes exemplos são fornecidos como forma de ilustração, e não é pretendido serem limitantes da presente invenção.

A supressão de um gene pode ser modulada alterando-se o comprimento do DNA que pode ser transcrito usado para supressão, cuja sequência é derivada do gene alvo para supressão. Muitos métodos podem ser usados para suprimir um gene que usa mecanismos de silenciamento de gene pós-transcricional. Sem estar limitado à teoria, acredita-se que estes métodos tenham em comum a expressão de uma molécula de RNA que hibridiza para outra molécula de RNA. Surpreendentemente, pode ser vantajoso usar uma molécula de RNA de comprimentos particulares para modular ou moderar a supressão dos níveis de expressão de estado constante de um gene endógeno alvo.

Supressão de gene de FAD2-1 leva a níveis elevados de ácido oléico e redução de níveis de ácido linoléico. Quando FAD2-1 é suprimido pesadamente, os níveis de ácido oléico podem ser maiores do que 65%, que causa uma redução em níveis de ácido palmítico e ácido linolênico. Por exemplo, quando FAD2-1 é suprimido, os níveis de ácido oléico podem alcançar 85% e os níveis de ácido palmítico e esteárico combinados são reduzidos em cerca de 10%. Semelhantemente, a sub-regulação de FATB resulta em níveis diminuídos de ácidos graxos saturados, principalmente palmitato. Quando FAD2 e FATB são suprimidos, então aqueles níveis oléicos são de cerca de 85%, os níveis de saturados são de cerca de 10%. Quando FAD2 e FATB são suprimidos, então aqueles níveis de oléico são cerca de 85%, os níveis de saturados podem cair para abaixo de 10%.

Levando em conta a presente invenção, os níveis de saturados podem ser reduzidos para menos do que 10% sem aumentar os ácidos oléicos acima de 85%. Em uma modalidade, a supressão de FAD2 é modulada reduzindo o comprimento de íntron de FAD2-1 introduzido na
5 planta. Menos supressão de FAD2 resulta em níveis moderados de ácido oléico, aproximadamente 40-85% de ácido oléico. A supressão de FAD2 é reduzida quando o comprimento do fragmento de íntron de FAD2-1 introduzido é reduzido. Por exemplo, um íntron de FAD2-1 reduzido em comprimento em pelo menos 100 nucleotídeos contíguos pode reduzir a
10 supressão de FAD2 e o aumento correspondente em ácido oléico e diminuir em níveis de ácido linoléico.

A relação entre a diminuição em supressão de gene endógeno e a diminuição em comprimento de DNA homólogo pode ser determinada empiricamente introduzindo comprimentos diferentes de DNA. Por exemplo,
15 a quantidade de redução em supressão obtenível por redução do comprimento de DNA introduzido homólogo pode ser determinada deletando-se as porções crescentes do DNA homólogo sendo introduzido e ensaiando para expressão do gene alvo.

Incluído na presente invenção é um método para moderar a
20 supressão de FAD2 ao mesmo tempo em que ainda tendo uma redução forte de níveis saturados em uma planta. Em tal planta, os níveis de ácido oléico podem variar de 40-85%. Semelhantemente, menos do que a supressão completa de FATB ocorre quando as regiões não transladas combinadas 3' e 5' são introduzidas quando comparadas quando o gene
25 FATB de tamanho natural é introduzido em uma célula hospedeira. Da mesma maneira, os níveis de supressão de FATB são reduzidos quando a parte 5' da estrutura de leitura aberta, que principalmente codifica o peptídeo de trânsito de cloroplasto, é introduzida em uma célula hospedeira. Em células com FAD2 e FATB suprimiu usando métodos de acordo com a
30 presente invenção, níveis de ácido oléico podem ser 40-85% ao mesmo tempo em que os níveis saturados podem estar entre 1 a 9 por cento.

Em uma modalidade, a presente invenção está voltada a um

método de modular a supressão de gene para reduzir a supressão relativa à supressão de um elemento de gene inteiro, onde um elemento de gene inteiro pode ser um gene inteiro, um exon inteiro, um íntron inteiro, uma seqüência de sinal inteira, ou um UTR inteiro, em seguida construindo uma

5 molécula de ácido nucléico recombinante que compreende um fragmento da seqüência endógena do elemento de gene; iniciando a expressão da molécula de ácido nucléico recombinante em uma célula hospedeira; e suprimindo o gene endógeno com a molécula de ácido nucléico recombinante. O gene que é suprimido pode ser qualquer gene, incluindo

10 FAD2 e FATB. Em uma modalidade, a presente invenção está voltada a um método para modular supressão de FAD2 ou FATB que compreende: expressar uma seqüência de elemento de gene FAD2 ou FATB parcial em uma célula hospedeira onde um elemento de gene FAD2 ou FATB é de um gene FAD2 ou FATB endógeno na célula hospedeira e uma seqüência de

15 elemento de gene FAD2 ou FATB pode ser um gene FAD2 ou FATB, um exon de FAD2 ou FATB, um íntron de FAD2 ou FATB, uma região de codificação de peptídeo de trânsito FAD2 ou FATB, ou um UTR de FAD2 ou FATB; e a seqüência de elemento de gene FAD2 ou FATB parcial é menor do que a seqüência de elemento de gene FAD2 ou FATB inteira; e

20 suprimindo um FAD2 ou FATB endógeno com a seqüência de elemento de gene FAD2 ou FATB parcial onde os níveis de supressão do gene FAD2 ou FATB endógeno na célula hospedeira são menores do que os níveis de supressão do gene FAD2 ou FATB endógeno em uma célula hospedeira com uma base genética similar e uma segunda seqüência de ácido nucléico

25 de FAD2 ou FATB que compreendem a seqüência de elemento de gene FAD2 ou FATB inteira do elemento de gene FAD2 ou FATB.

Em outra modalidade, a presente invenção está voltada a um método para alterar a composição de óleo de uma célula de planta transformando-se uma célula de planta com uma molécula de ácido nucléico

30 recombinante que compreende uma seqüência de DNA que suprime expressão endógena de FAD2, FATB, ou FAD2 e FATB onde a seqüência de DNA compreende uma seqüência de ácido nucléico de FAD2, FATB, ou

FAD2 e FATB que é mais curta do que a sequência inteira de um elemento genético inteiro selecionado de um gene, um exon, um íntron, uma região de codificação de peptídeo de trânsito, um 3'-UTR, um 5'-UTR, e uma estrutura de leitura aberta; e cultivando a célula de planta sob condições onde a referida transcrição de sequência de DNA é iniciada, por meio da qual a composição de óleo é alterada relativa a uma célula de planta com uma base genética semelhante porém necessitando da molécula de ácido nucléico recombinante. Um elemento de gene FAD2 ou FATB pode ser encurtado em comprimento por 50, 75, 100, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 800, 1000, 2000, 3000, ou 4000 nucleotídeos. Um comprimento de um elemento de gene FAD2 ou FATB pode ser 50, 75, 100, 150, 175, 200, 220, 250, 300, 320, 350, 400, 420, 450, 500, 550, 600, 800, ou 1000 nucleotídeos.

Em outra modalidade, a presente invenção está voltada a um método para aumentar o conteúdo de ácido oléico e reduzir o conteúdo de ácido graxo saturado em uma semente de planta: i) encurtando-se o comprimento de uma sequência de DNA de FAD2 exógena em uma célula hospedeira até que a quantidade de supressão de expressão de FAD2 de uma planta transformada seja reduzida pelo menos parcialmente relativa à supressão de expressão de FAD2 em uma célula hospedeira com uma base genética similar e uma sequência de DNA de gene FAD2 exógeno inteiro; e ii) cultivando-se uma planta com uma molécula de ácido nucléico que compreende a sequência de DNA de FAD2 encurtada onde a sequência de DNA de FAD2 encurtada pelo menos parcialmente suprime a expressão endógena de FAD2; e iii) cultivando-se uma planta que produz semente com um conteúdo de ácido graxo saturado reduzido relativo a semente de uma planta tendo uma base genética similar porém necessitando de sequência de DNA de FAD2 encurtada. A quantidade que a sequência de DNA de FAD2 exógena é encurtada para pelo menos parcialmente reduzir a supressão do FAD2 endógeno pode ser determinada empiricamente introduzindo-se comprimentos diferentes de DNA. Por exemplo, a quantidade de redução em supressão obtenível reduzindo-se o comprimento

de DNA introduzido homólogo, pode ser determinada deletando-se as porções crescentes do DNA homólogo sendo introduzido e ensaiando quanto à expressão do gene alvo. A quantidade de supressão de expressão de FAD2 pode ser obtida como uma média de três ou mais, seis ou mais, 5 dez ou mais, quinze ou mais, ou vinte ou mais sementes de uma planta.

Em outra modalidade, a presente invenção está voltada a um método para produzir uma planta transformada que tem semente com um conteúdo de ácido graxo saturado reduzido transformando-se uma célula de planta com uma molécula de ácido nucléico recombinante que compreende 10 uma seqüência de DNA que suprime a expressão endógena de FAD2 e FATB onde a seqüência de DNA compreende uma seqüência de ácido nucléico de FAD2 que é mais curta do que a seqüência inteira de um elemento genético inteiro selecionado de um gene, um exon, um íntron, uma região de codificação de peptídeo de trânsito, e um UTR; e cultivando a 15 planta transformada onde a planta transformada produz semente com um teor de ácido graxo saturado reduzido relativo à semente de uma planta tendo uma base genética similar porém necessitando da referida molécula de ácido nucléico recombinante.

Em outra modalidade, a presente invenção está voltada a um 20 método de modular a composição de ácido graxo de óleo de uma semente de uma colheita de semente de óleo temperada isolando-se um elemento genético de pelo menos 40 nucleotídeos em comprimento que é capaz de suprimir a expressão de um gene endógeno na série de reação de síntese de ácido graxo; gerando-se mais do que um fragmento encurtado do 25 elemento genético; introduzindo-se cada do mais que um fragmento encurtado em uma célula de planta da colheita de semente de óleo temperada para produzir planta transgênica; e selecionando-se uma planta transgênica que compreende um fragmento encurtado de determinado comprimento e seqüência que efetuam uma mudança desejável na 30 composição de ácido graxo de óleo de semente. Em uma modalidade preferida, o método acima também inclui construir uma construção de DNA recombinante tendo pelo menos dois fragmentos encurtados de dois genes

endógenos diferentes que efetuam mudanças desejáveis diferentes em composição de ácido graxo de óleo de semente; introduzir o constructo de DNA recombinante em uma célula de planta da colheita de semente de óleo temperada para produzir plantas transgênicas; e selecionar uma planta transgênica que compreende o pelo menos dois fragmentos encurtados e uma composição de ácido graxo de óleo de uma semente que tem mais do que uma mudança desejável efetuada pelo, pelo menos dois fragmentos encurtados.

Em outra modalidade, a presente invenção está voltada a uma semente de soja que exibe uma composição de óleo que tem um conteúdo de ácido graxo saturado fortemente reduzido e um conteúdo de ácido oléico moderadamente aumentado que tem uma sequência de DNA que suprime a expressão endógena de FAD2 em uma célula hospedeira onde a sequência de DNA tem uma sequência de ácido nucléico de FAD2 que é mais curta do que a sequência inteira de um elemento genético inteiro selecionado de um gene, um exon, um íntron, uma região de codificação de peptídeo de trânsito, e um UTR.

Exemplos

Os seguintes exemplos são incluídos para demonstrar modalidades preferidas da invenção. Deveria ser apreciado por aqueles versados na técnica que as técnicas descritas nos exemplos que seguem representam técnicas descritas pelo inventor para funcionar bem na prática da invenção, e deste modo podem ser consideradas constituírem modos preferidos para sua prática. Entretanto, aqueles de experiência na técnica deveriam, levando em conta a presente descrição, apreciar que podem ser feitas muitas mudanças nas modalidades específicas que são descritas e ainda obtêm um resultado igual ou similar sem afastar-se do conceito, espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, será evidente que certos agentes que são ambos quimicamente e fisiologicamente relacionados podem ser substituídos pelos agentes descritos aqui ao mesmo tempo em que os mesmos resultados ou resultados similares seriam obtidos. Todos tais substitutos e modificações similares evidentes para aqueles

versados na técnica são julgados estar dentro do espírito, escopo e conceito da invenção como definido pelas reivindicações apensas.

Exemplo 1. Isolamento de Sequências de FATB-2

Tecido de folha é obtido de variedade de soja Asgrow A3244, moído em nitrogênio líquido e é armazenado em 80°C até uso. Seis ml de tampão de extração de SDS (650 ml de ddH₂O estéril, 100 ml de 1M de Tris-Cl pH 8, 100 ml de 0,25M de EDTA, 50 ml de SDS a 20%, 100 ml de 5M de NaCl, 4μl de beta-mercaptoetanol) são adicionados a 2 ml de tecido de folha congelada/moída, e a mistura é incubada a 65°C durante 45 minutos. A amostra é agitada a cada 15 minutos. 2 ml de 5M de acetato de potássio gelado são adicionados à amostra, a amostra é agitada, e então é incubada em gelo durante 20 minutos. 3 ml de CHCl₃ são adicionados à amostra e a amostra é agitada durante 10 minutos.

A amostra é centrifugada em 10.000 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante é coletado. 2 ml de isopropanol são adicionados ao sobrenadante e misturados. A amostra é então centrifugada a 10.000 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante é escoado. O pélete é novamente suspenso em 200 μl de RNase e incubado a 65°C durante 20 minutos. 300 μl de acetato de amônio/isopropanol (1:7) são adicionados e misturados. A amostra é então centrifugada em 10.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante é descartado. O pélete é enxaguado com 500 μl de etanol a 80% e permitido secar a ar. O pélete de DNA genômico é então novamente suspenso em 200 μl de T10E1 (10 mM de Tris:1mM de EDTA).

Uma sequência contígua de cDNA de FATB-2 de soja (SEQ ID NO: 42) é usada para designar treze oligonucleotídeos que ampliam o gene: F1 (SEQ ID NO: 48), F2 (SEQ ID NO: 49), F3 (SEQ ID NO: 50), F4 (SEQ ID NO: 51), F5 (SEQ ID NO: 52), F6 (SEQ ID NO: 53), F7 (SEQ ID NO: 54), R1 (SEQ ID NO: 55), R2 (SEQ ID NO: 56), R3 (SEQ ID NO: 57), R4 (SEQ ID NO: 58), R5 (SEQ ID NO: 59), e R6 (SEQ ID NO: 60). Os oligonucleotídeos são usados em pares para amplificação de PCR do DNA genômico de soja isolada: par 1 (F1 + R1), par 2 (F2 + R1), par (F3 + R2), par 4 (F4 + R3), par 5 (F5 + R4), par 6 (F6 + R5), e par 7 (F7 + R6). A amplificação de PCR para

par 5 é realizada como segue: 1 ciclo, 95°C durante 10 minutos; 30 ciclos, 95°C durante 15 segundos, 43°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 segundos; 1 ciclo, 72°C durante 7 minutos. Para todos os outros pares de oligo, as amplificações de PCR são realizadas como segue: 1 ciclo, 95°C
 5 durante 10 minutos; 30 ciclos, 95°C durante 15 segundos, 48°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 segundos; 1 ciclo, 72°C durante 7 minutos. fragmentos positivos São obtidos de pares de iniciador 1, 2, 4, 5, 6 e 7. Cada fragmento é clonado no vetor pCR2.1 (Invitrogen). Os fragmentos 2, 4, 5 e 6 são confirmados e seqüenciados. Estas quatro seqüências são alinhadas
 10 para formar uma seqüência genômica para o gene de FATB-2 (SEQ ID NO: 43).

Quatro íntrons são identificados no gene FATB-2 de soja por comparação da seqüência genômica com a seqüência de cDNA: íntron I (SEQ ID NO: 44) amplia base 119 a base 1333 da seqüência genômica
 15 (SEQ ID NO: 43) e é 1215 pares de base em comprimento; íntron II (SEQ ID NO: 45) amplia base 2231 a base 2568 da seqüência genômica (SEQ ID NO: 43) e é 338 pares de base em comprimento; íntron III (SEQ ID NO: 46) amplia a base 2702 a base 3342 da seqüência genômica (SEQ ID NO: 43) e é 641 pares de base em comprimento; e íntron IV (SEQ ID NO: 47) amplia a
 20 base 3457 a base 3823 da seqüência genômica (SEQ ID NO: 43) e é 367 pares de base em comprimento.

Exemplo 2. Constructos de Supressão

2A. Constructos de FAD2-1

O íntron de FAD2-1A No. 1 (SEQ ID NO: 1) é clonado no cassete
 25 de expressão, pCGN3892, em orientações de sentido e anti-sentido. O vetor pCGN3892 contém o promotor 7S de soja e uma ervilha rbcS 3'. Ambas as fusões de gene são então separadamente ligadas em pCGN9372, um vetor que contém o gene de EPSPS de CP4 regulado pelo promotor de FMV. Os constructos de expressão resultantes (sentido de pCGN5469 e anti-sentido
 30 de pCGN5471, descritos nas figuras 1 e 2, respectivamente) são usadas para transformação de soja.

O íntron de FAD2-1B (SEQ ID NO: 2) é fundido no terminal de 3'

do íntron de FAD2-1A No.1 em plasmídeo pCGN5468 (contém o promotor 7S de soja fundido ao íntron de FAD2-1A (sentido) e uma ervilha rbcS 3') ou pCGN5470 (contém o promotor 7S de soja fundido ao íntron de FAD2-1A (anti-sentido) e uma ervilha rbcS 3') em orientação de sentido e anti-sentido, respectivamente. As fusões de combinação de íntron resultantes são então separadamente ligadas em pCGN9372, um vetor que contém o gene de EPSPS de CP4 regulado pelo promotor de FMV. As construções de expressão resultantes (sentido de íntron de pCGN5485, FAD2-1A & FAD2-1B e pCGN5486, FAD2-1A & anti-sentido de íntron de FAD2-1B) são usados para transformação de soja.

2B. Constructos de FAD3-1

Íntrons de FAD3-1A No. 1, No. 2, No. 4 e No. 5 (SEQ ID NOs: 7, 8, 10 e 11, respectivamente), íntrons de FAD3-1B No. 3C (SEQ ID NO: 23) e No. 4 (SEQ ID NO: 24), são todos separadamente ligados em pCGN3892, em orientação de sentido ou anti-sentido. pCGN3892 contém o promotor 7S de soja e uma ervilha rbcS 3'. Estas fusões são ligadas em pCGN9372, um vetor que contém o gene de EPSPS de CP4 regulado pelo promotor de FMV para transformação em soja. Os constructos de expressão resultantes (pCGN5455, sentido de íntron de FAD3-1A No. 4; pCGN5459, anti-sentido de íntron de FAD3-1A No. 4; pCGN5456, sentido de íntron de FAD3 No. 5; pCGN5460, anti-sentido de íntron de FAD3-1A No. 5; pCGN5466, anti-sentido de íntron de FAD3-1A No. 2; pCGN5473, anti-sentido de íntron de FAD3-1A No. 1) são usados para transformação de soja.

2C. Constructos de FatB

A sequência de íntron II de FATB-1 de soja (SEQ ID NO: 30) é ampliada por PCR que usa um clone genômico parcial de FATB-1 como um modelo. A amplificação de PCR é realizada como segue: 1 ciclo, 95°C durante 10 min; 25 ciclos, 95°C durante 30 segundos, 62°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos; 1 ciclo, 72°C para 7 min. A amplificação de PCR resulta em um produto que é 854 pares de base longo, incluindo sítios de restrição reconstruídos em ambos os terminais. O produto de PCR é clonado diretamente no pCGN3892 de cassete de expressão em

orientação de sentido, por via de sítios de XhoI construídos sobre os terminais 5' dos iniciadores de PCR, para formar pMON70674. PCGN3892 de vetor contém o promotor 7S de soja e uma ervilha rbcS 3'. pMON70674 é então cortado com NotI e ligado em pMON41164, um vetor que contém o

5 gene de EPSPS de CP4 regulado pelo promotor de FMV. O constructo de expressão de gene resultante, pMON70678, é usado para transformação de soja que usa métodos de Agrobactéria.

2D Constructos de Combinação

Os constructos de expressão são feitos contendo várias

10 permutações de: 1) umas seqüências de FAD2-1 sozinhas (para métodos de produção de soja pouco linolênica, meio oléica) e 2) combinações seqüências de DNA de FAD2-1 e FATB. As seqüências de DNA são quaisquer daquelas descritas, ou ilustradas na Tabela 2, ou qualquer outro

15 grupo de seqüências de DNA que contém várias combinações de regiões de não-codificação ou codificação de FAD2 e/ou FATB de sentido, anti-sentido, ou sentido e anti-sentido de forma que eles sejam capazes de formar os constructos de dsRNA, constructos de co-supressão de sentido, constructo de anti-sentido, ou várias combinações do anterior.

Figura 4 descreve seqüências de DNA que são capazes de

20 expressar a co-supressão de constructos de sentido ou anti-sentido de acordo com a presente invenção, as seqüências de não-codificação que são descritas nas Tabelas 1 e 2 abaixo. As seqüências de não-codificação podem ser seqüências únicas, combinações de seqüências (por exemplo, o 5'UTR ligado ao 3'UTR), ou qualquer combinação dos anteriores. Para

25 expressar uma construção de co-supressão de sentido, todas as seqüências de não-codificação são seqüências de sentido, e para expressar um constructo de anti-sentido, todas as seqüências de não-codificação são seqüências de anti-sentido. Para expressar constructos de sentido e anti-sentido, são fornecidas seqüências de não-codificação de sentido e anti-

30 sentido.

Figura 5 descreve vários primeiros grupos de seqüências de DNA que são capazes de expressar constructo de dsRNA de acordo com a

presente invenção, as seqüências de não-codificação das quais são descritas nas Tabelas 1 e 2 abaixo. O primeiro grupo de seqüências de DNA descrito na figura 5 compreende pares de seqüências de sentido e anti-sentido relacionadas, organizadas tal que, por exemplo, o RNA expresso

5 pela primeira seqüência de sentido seja capaz de formar um RNA de filamento duplo com o RNA de anti-sentido expresso pela primeira seqüência de anti-sentido. Por exemplo, se referindo ao vetor mais alto da figura 5 e combinação ilustrativa Nº 1 (da Tabela 1), o primeiro grupo de seqüências de DNA compreende uma seqüência de FAD2-1 de sentido, uma seqüência

10 de FAD3-1 de sentido, uma seqüência de FAD2-1 de anti-sentido e uma seqüência de FAD3-1 de anti-sentido. Ambas as seqüências de anti-sentido correspondem às seqüências de sentido de forma que os produtos de expressão do primeiro grupo de seqüências de DNA sejam capazes de formar um RNA de filamento duplo com cada outro. As seqüências de

15 sentido podem ser separadas das seqüências de anti-sentido por uma seqüência espaçadora, preferivelmente uma que promova a formação de uma molécula de dsRNA. Os exemplos de tais seqüências espaçadoras incluem aqueles apresentados em Wesley e outros, supra, e Hamilton e outros, Plant J., 15:737-746 (1988). O promotor é qualquer promotor

20 funcional em uma planta, ou qualquer promotor de planta. Os exemplos não limitantes de promotores adequados são descritos na Parte A da Descrição Detalhada.

O primeiro grupo de seqüências de DNA é inserido em um constructo de expressão na orientação de sentido ou anti-sentido usando

25 uma variedade de técnicas de manipulação de DNA. Se for conveniente os sítios de restrição estarem presentes nas seqüências de DNA, eles serão inseridos no constructo de expressão digerindo-se com as endonucleases de restrição e ligação no constructo que foi digerido em um ou mais dos sítios de clonagem disponíveis. Se sítios de restrição convenientes não estão

30 disponíveis nas seqüências de DNA, o DNA ou do constructo ou das seqüências de DNA é modificado em uma variedade de modos para facilitar a clonagem das seqüências de DNA no constructo. Os exemplos de

- métodos para modificar o DNA incluem por PCR, ligador sintético ou ligação de adaptador, mutagênese de sítio direcionado in vitro, carregamento em ou redução de terminais de 5' ou 3' de projeção, e similares. Estes e outros métodos de manipulação de DNA são bem-conhecidos por aqueles de
- 5 experiência ordinária na técnica.

Tabela 1

Combinações Ilustrativas	Seqüências de Não-codificação ou Codificação (sentido ou anti-sentido)			
	Primeira	Segunda	Terceira	Quarta
1	FAD2-1A ou B	FAD3-1A ou B ou C		
2	FAD3-1A ou B ou C	FAD2-1A ou B		
3	FAD2-1A ou B	FAD3-1A ou B ou C	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C	
4	FAD2-1A ou B	FAD3-1A ou B ou C	FATB-1	
5	FAD2-1A ou B	FATB-1	FAD3-1A ou B ou C	
6	FAD3-1A ou B ou C	FAD2-1A ou B	FATB-1	
7	FAD3-1A ou B ou C	FATB-1	FAD2-1A ou B	
8	FATB-1	FAD3-1A ou B ou C	FAD2-1A ou B	
9	FATB-1	FAD2-1A ou B	FAD3-1A ou B ou C	
10	FAD2-1A ou B	FAD3-1A ou B ou C	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C	FATB-1
11	FAD3-1A ou B ou C	FAD2-1A ou B	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C	FATB-1
12	FAD3-1A ou B ou C	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C	FAD2-1A ou B	FATB-1
13	FAD2-1A ou B	FAD3-1A ou B ou C	FATB-1	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C

Combinações Ilustrativas	Seqüências de Não-codificação ou Codificação (sentido ou anti-sentido)			
	Primeira	Segunda	Terceira	Quarta
14	FAD3-1A ou B ou C	FAD2-1A ou B	FATB-1	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C
15	FAD3-1A ou B ou C	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C	FATB-1	FAD2-1A ou B
16	FAD2-1A ou B	FATB-1	FAD3-1A ou B ou C	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C
17	FAD3-1A ou B ou C	FATB-1	FAD2-1A ou B	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C
18	FAD3-1A ou B ou C	FATB-1	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C	FAD2-1A ou B
19	FATB-1	FAD2-1A ou B	FAD3-1A ou B ou C	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C
20	FATB-1	FAD3-1A ou B ou C	FAD2-1A ou B	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C
21	FATB-1	FAD3-1A ou B ou C	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C	FAD2-1A ou B
22	FAD2-1A ou B	FAD3-1A ou B ou C	FATB-2	
23	FAD2-1A ou B	FATB-2	FAD3-1A ou B ou C	
24	FAD3-1A ou B ou C	FAD2-1A ou B	FATB-2	
25	FAD3-1A ou B ou C	FATB-2	FAD2-1A ou B	
26	FATB-2	FAD3-1A ou B ou C	FAD2-1A ou B	
27	FATB-2	FAD2-1A ou B	FAD3-1A ou B ou C	

Combinações Ilustrativas	Seqüências de Não-codificação ou Codificação (sentido ou anti-sentido)			
	Primeira	Segunda	Terceira	Quarta
28	FAD2-1A ou B	FAD3-1A ou B ou C	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C	FATB-2
29	FAD3-1A ou B ou C	FAD2-1A ou B	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C	FATB-2
30	FAD3-1A ou B ou C	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C	FAD2-1A ou B	FATB-2
31	FAD2-1A ou B	FAD3-1A ou B ou C	FATB-2	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C
32	FAD3-1A ou B ou C	FAD2-1A ou B	FATB-2	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C
33	FAD3-1A ou B ou C	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C	FATB-2	FAD2-1A ou B
34	FAD2-1A ou B	FATB-2	FAD3-1A ou B ou C	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C
35	FAD3-1A ou B ou C	FATB-2	FAD2-1A ou B	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C
36	FAD3-1A ou B ou C	FATB-2	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C	FAD2-1A ou B
37	FATB-2	FAD2-1A ou B	FAD3-1A ou B ou C	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C
38	FATB-2	FAD3-1A ou B ou C	FAD2-1A ou B	FAD3-1A diferente ou Seqüência B ou C
39	FATB-2	FAD3-1A ou B ou C	FAD3-1A diferente ou Seqüência B	FAD2-1A ou B

Combinações Ilustrativas	Seqüências de Não-codificação ou Codificação (sentido ou anti-sentido)			
	Primeira	Segunda	Terceira	Quarta
			ou C	
40	FAD2-1A ou B	FATB-1		
41	FAD2-1A ou B	FATB-2		
42	FAD2-1A ou B	FATB-1	FATB-2	
43	FAD2-1A	FAD2-1B	FATB-1	
44	FAD2-1A	FAD2-1B	FATB-1	FATB-2
45	FAD2-1A ou B	FAD2-1A ou B		
46	FATB-1 FATB-2	FATB-1 ou FATB-2		

Tabela 2

	Correlação de SEQ ID NOs com Seqüências na Tabela 1						
	FAD2-1A	FAD2-1B	FAD3-1A	FAD3-1B	FAD3-1C	FATB-1	FATB-2
3'UTR	SEQ NO: 5	n/a	SEQ NO: 16	SEQ NO: 26	n/a	SEQ NO: 36	n/a
5'UTR	SEQ NO: 6	n/a	SEQ NO: 17	SEQ NO: 27	n/a	SEQ NO: 37	n/a
5'+3' UTR (ou 3'+5' UTR)	SEQ Ligadas NOs: 5 e 6	n/a	SEQ Ligadas NOs: 16 e 17	SEQ Ligadas NOs: 26 e 27	n/a	SEQ Ligadas NOs: 36 e 37	n/a
Intron No.1	SEQ NO: 1	SEQ NO: 2	SEQ NO: 7	SEQ NO: 19	n/a	SEQ NO: 29	SEQ NO: 44
Intron No.2	n/a	n/a	SEQ NO: 8	SEQ NO: 20	n/a	SEQ NO: 30	SEQ NO: 45
Intron No.3	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	SEQ NO: 31	SEQ NO: 46
Intron No.3A	n/a	n/a	SEQ NO: 9	SEQ NO: 21	n/a	n/a	n/a
Intron No.3B	n/a	n/a	SEQ NO: 12	SEQ NO: 22	n/a	n/a	n/a
Intron No.3C	n/a	n/a	SEQ NO: 13	SEQ NO: 23	n/a	n/a	n/a
Intron No.4	n/a	n/a	SEQ NO: 10	SEQ NO: 24	SEQ NO: 14	SEQ NO: 32	SEQ NO: 47
Intron No.5	n/a	n/a	SEQ NO: 11	SEQ NO: 25	n/a	SEQ NO: 33	n/a

Intron No.6	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	SEQ NO: 34	n/a
Intron No.7	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	SEQ NO: 35	n/a

Exemplo 3

3A. Constructos de Anti-sentido

Se referindo agora à figura 7, as seqüências de não-codificação de FATB-2 de soja (SEQ ID NOs: 44-47), seqüências de não-codificação de FATB-1 (SEQ ID NOs: 29-37), e seqüências de não-codificação de FAD2-1 (SEQ ID NOs: 1 e 5-6) são ampliadas por PCR para resultar em produtos de PCR que incluem sítios de restrição re-construídos em ambos os terminais. Os produtos de PCR são clonados diretamente em orientação de sentido e anti-sentido em um vetor que contém o promotor 7S α ' de soja de uma seqüência de terminação tml 3'. O vetor é então cortado com uma endonuclease de restrição apropriada e ligado em pMON80612 um vetor que contém o gene de EPSPS de CP4 regulado pelo promotor de FMV e uma seqüência de terminação de ervilha Rubisco E9 3'. O constructo de expressão de gene resultante é descrita na maioria da constructo de base da figura 7 e é usado para transformação usando métodos como descrito aqui.

3B. Montagem In Vivo

Um aspecto da presente invenção inclui um constructo de DNA que monta em uma unidade de transcrição recombinante em um cromossomo de planta em planta que é capaz de formar o RNA de filamento duplo. A montagem de tais constructos e os métodos para montagem in vivo de uma unidade de transcrição recombinante para supressão de gene são descritos no Pedido Internacional No. PCT/US2005/00681, desse modo incorporado por referência em sua totalidade.

pMON95829 é um constructo usado para montagem in vivo que tem dois segmentos de T-DNA, cada flanqueado por elementos de borda de T-DNA de Agrobactéria, isto é DNA de borda direita (RB) e DNA de borda esquerda (LB). O primeiro T-DNA contém um promotor 7S α ' de soja operavelmente ligando-se a um íntron 1 de FAD2-1A de soja (SEQ ID NO: 1), que é reduzido em 100 nucleotídeos contíguos do terminal 3' e ligado aos

42 nucleotídeos contíguos de um 5' UTR de FATB-1a, seguido pela região de codificação de peptídeo de trânsito de cloroplasto de FATB-1A ("CTP"), e um gene de EPSPS de CP4 operavelmente ligado a um promotor de FMV aumentado e uma sequência de terminação de ervilha Rubisco E9 3' tudo

5 flanqueado por elementos de borda de T-DNA de Agrobactéria, isto é DNA de borda direita (RB) e DNA de borda esquerda (LB). No mesmo vetor no segundo segmento de T-DNA, flanqueado por outro RB e LB, está uma sequência de terminação H6 3' operavelmente ligada a um íntron 1 de

10 FAD2-1A de soja (SEQ ID NO: 1), que é reduzido em 100 nucleotídeos contíguos do terminal 3' e ligado aos 42 nucleotídeos contíguos de um 5' UTR de FATB-1a, seguiu pela região de codificação de peptídeo de trânsito de cloroplasto ("CTP") de FATB-1A. Os constructos de expressão de gene resultantes são usados para transformação usando métodos como descrito aqui.

15 pMON97595 é um constructo usado para montagem in vivo que tem dois segmentos de T-DNA, cada flanqueado por Elementos de borda de T-DNA de Agrobactéria , isto é DNA de borda direita (RB) e DNA de borda esquerda (LB). O primeiro segmento de T-DNA contém um promotor de 7S α ' de soja operavelmente ligado a um íntron 1 de FAD2-1A de soja (SEQ ID

20 NO: 1) que é reduzido através de 320 nucleotídeos contíguos do terminal 3' e ligado aos 42 nucleotídeos contíguos de um 5' UTR de FATB-1a seguido pela região de codificação de peptídeo de trânsito de cloroplasto ("CTP") de FATB-1A, e um Gene de EPSPS de CP4 operavelmente ligado a um promotor de FMV aumentado e uma sequência de terminação 3' de ervilha

25 rubisco E9 3', tudo flanqueado por Elementos de borda de T-DNA de Agrobactéria , isto é DNA de borda direita (RB) e DNA de borda esquerda (LB). No segundo segmento de T-DNA, flanqueado por outro RB e LB, é uma sequência de terminação 3' H6 operavelmente ligada a um íntron 1 de FAD2-1A de soja (SEQ ID NO: 1), que é reduzido em 320 nucleotídeos

30 contíguos do terminal 3' e ligado aos 42 nucleotídeos contíguos de um 5' UTR de FATB-1a seguido pela região de codificação de CTP de FATB-1A. O constructo de expressão de gene resultante é usado para transformação que

usa métodos como descrito aqui.

pMON97581 é um constructo usado para montagem in vivo que tem dois segmentos de T-DNA, cada flanqueado por elementos de borda de T-DNA de Agrobactéria, isto é DNA de borda direita (RB) e DNA de borda esquerda (LB). O primeiro segmento de T-DNA contém um promotor de 7S α ' de soja operavelmente ligado a um íntron 1 de FAD2-1A de soja (SEQ ID NO: 1) que é reduzido em 320 nucleotídeos contíguos do terminal 3' e ligado à região de codificação de peptídeo de trânsito de cloroplasto ("CTP") de FATB-1A, e um gene de EPSPS de CP4 operavelmente ligado a um promotor de FMV aumentado e uma sequência de terminação 3' de ervilha Rubisco E9, tudo flanqueado por elementos de borda de T-DNA de Agrobactéria, isto é DNA de borda direita (RB) e DNA de borda esquerda (LB). No mesmo constructo, no segundo segmento de T-DNA, flanqueado por outro RB e LB, está uma Sequência de terminação 3' H6 operavelmente ligada a um íntron 1 de FAD2-1A de soja (SEQ ID NO: 1) que é reduzido em 320 nucleotídeos contíguos do terminal 3' e ligado a região de codificação de CTP de FATB-1a. O constructo de expressão de gene resultante é usado para transformação que usa métodos como descrito aqui.

pMON97596 é um constructo usado para montagem in vivo tendo dois segmentos de T-DNA, cada flanqueado por elementos de borda de T-DNA de Agrobactéria, isto é DNA de borda direita (RB) e DNA de borda esquerda (LB). O primeiro segmento de T-DNA contém um promotor de 7S α ' de soja operavelmente ligado a um íntron 1 de FAD2-1A de soja (SEQ ID NO: 1) que é reduzido em 320 nucleotídeos contíguos do terminal 3' e ligado a 5' 180 pares de base da região de codificação de peptídeo de trânsito de cloroplasto ("CTP") de FATB-1A, e um gene de EPSPS de CP4 operavelmente ligado a um promotor de FMV aumentado e uma sequência de terminação 3' de ervilha Rubisco E9, tudo flanqueado por elementos de borda de T-DNA de Agrobactéria, isto é DNA de borda direita (RB) e DNA de borda esquerda (LB). No mesmo constructo, no segundo segmento de T-DNA, flanqueado por outro RB e LB, está uma sequência de terminação 3' H6 operavelmente ligada a um íntron 1 de FAD2-1A de soja (SEQ ID NO: 1)

que é reduzido em 320 nucleotídeos contíguos do terminal 3' e ligado ao 5' 180 pares de base da região de codificação de CTP de FATB-1a. O constructo de expressão de gene resultante é usado para transformação que usa métodos como descrito aqui.

5 pMON97597 é um constructo usado para montagem in vivo que tem dois segmentos de T-DNA, cada flanqueado por elementos de borda de T-DNA de Agrobactéria, isto é DNA de borda direita (RB) e DNA de borda esquerda (LB). O primeiro segmento de T-DNA contém um promotor de 7S α ' de soja operavelmente ligado a um íntron 1 de FAD2-1A de soja (SEQ ID
10 NO: 1) que é reduzido em 320 nucleotídeos contíguos do terminal 3' e ligado ao 5' 120bp da região de codificação de peptídeo de trânsito de cloroplasto ("CTP") de FATB-1, e um gene de EPSPS de CP4 operavelmente ligado a um promotor de FMV aumentado e uma sequência de terminação 3' de ervilha Rubisco E9, tudo flanqueado por elementos de borda de T-DNA de
15 Agrobactéria, isto é DNA de borda direita (RB) e DNA de borda esquerda (LB). No mesmo constructo, no segundo segmento de T-DNA, flanqueado por outro RB e LB, está uma sequência de terminação 3' H6 operavelmente ligada a um íntron 1 de FAD2-1A de soja (SEQ ID NO: 1) que é reduzido em 320 nucleotídeos contíguos do terminal 3' e ligado ao 5' 120 pares de base
20 da região de codificação de CTP de FATB-1a. O constructo de expressão de gene resultante é usado para transformação que usa métodos como descrito aqui.

 pMON97598 é um constructo usado para montagem in vivo que tem dois segmentos de T-DNA, cada flanqueado por elementos de borda de
25 T-DNA de Agrobactéria, isto é DNA de borda direita (RB) e DNA de borda esquerda (LB). O primeiro segmento de T-DNA contém um promotor de 7S α ' de soja operavelmente ligado a um íntron 1 de FAD2-1A de soja (SEQ ID NO: 1) que é reduzido em 340 nucleotídeos contíguos do terminal 3' e ligado à região de codificação de peptídeo de trânsito de cloroplasto ("CTP") de
30 FATB-1A, e um gene de EPSPS de CP4 operavelmente ligado a um promotor de FMV aumentado e uma sequência de terminação 3' de ervilha Rubisco E9, tudo flanqueado por elementos de borda de T-DNA de

Agrobactéria, isto é DNA de borda direita (RB) e DNA de borda esquerda (LB). No mesmo constructo, no segundo segmento de T-DNA, flanqueado por outro RB e LB, está uma sequência de terminação 3' H6 operavelmente ligada a um íntron 1 de FAD2-1A de soja (SEQ ID NO: 1) que é reduzido em 5 340 nucleotídeos contíguos do terminal 3' e ligado à região de codificação de CTP de FATB-1a. O constructo de expressão de gene resultante é usada para transformação que usa métodos como descrito aqui.

Quando os dois segmentos de T-DNA de qualquer uma das constructos acima (isto é, pMON95829, pMON97595, pMON97581, 10 pMON97597, pMON97598) são inseridos em um único lugar do cromossomo de um organismo hospedeiro em uma orientação de RB para RB, a unidade de transcrição montada tem um promotor de 7S α ' de soja operavelmente ligando o íntron 1 de FAD2-1A de soja orientado em sentido e anti-sentido e fragmentos de DNA de FATB-1a. Quando transcritas, as 15 seqüências de RNA operavelmente ligadas orientadas em sentido e anti-sentido são capazes de formar o RNA de filamento duplo efetivo para supressão de FAD2-1A e FATB.

Exemplo 4. Transformação e Análise de Planta

Os constructos dos Exemplos 2 e 3 são estavelmente 20 introduzidos em soja (por exemplo, variedade Asgrow A4922 ou variedade Asgrow A3244 ou variedade Asgrow A3525) pelos métodos descritos anteriormente, incluindo os métodos de McCabe e outros, Bio/Technology, 6:923-926 (1988), ou transformação mediada por Agrobactéria. As plantas de soja transformadas são identificadas através de seleção em meios que 25 contêm agente selecionável ou herbicidas. O herbicida pode ser glifosato quando um transgene que confere resistência ao glifosato for usado. Composições de ácido graxo são analisadas de linhagens de semente de soja transformadas com o constructo usando cromatografia de gás.

Para algumas aplicações, são descritas composições de ácido 30 graxo modificadas em sementes em desenvolvimento, considerando que em outros exemplos, tal como para análise de perfil de óleo, a detecção de modificações de ácido graxo que ocorre depois na série de reação de FAS,

ou para detecção de modificações secundárias para a composição de ácido graxo, a análise de ácido graxo ou óleo de sementes maduras é realizada. Além disso, análise de conteúdo de óleo e/ou ácido graxo de sementes individuais pode ser desejável, especialmente na detecção da modificação de óleo na segregação de populações de semente R1. Como usado aqui, a geração de R0 indica a planta que surge de protocolos de transformação / regeneração descritos aqui, a geração de R1 indica sementes crescidas na planta R0 transgênica fertilizada de modo cruzado contínuo. As plantas R1 são crescidas das sementes R1.

10 As composições de ácido graxo são determinadas para a semente de linhagens de soja transformadas com o constructo do Exemplo 3. Uma a dez sementes de cada das linhagens de soja de controle e transgênicas são moídas usando um homogenizador de tecido individualmente (Pro Scientific) para extração de óleo. O óleo de semente de soja moída é extraído durante a noite em 1,5 ml de heptano que contém triptadecanoína (0,50 mg/ml). As alíquotas de 200 µl do óleo extraído são derivadas para ésteres de metila com a adição de 500 µl de metóxido de sódio em metanol absoluto. A reação de derivatização é permitida progredir durante 20 minutos em 50°C. A reação é parada pela adição simultânea de 15 500 µl de 10% (peso/volume) de cloreto de sódio e 400 µl de heptano. Os ésteres de metila de ácido graxo resultantes extraídos em hexano são resolvidos através de cromatografia de gás (GC) em um modelo 6890 GC Hewlett-Packard (Palo Alto, CA). A GC foi ajustada com uma coluna Supelcowax 250 (30 m, 0,25 mm de id, 0,25 microns de espessura de película) (Supelco, Bellefonte, PA). A temperatura de coluna é 175°C em 20 injeção e a temperatura programada de 175°C a 245°C a 175°C em 40°C/min. As temperaturas do Injetor e detector são 250°C e 270°C, respectivamente.

Exemplo 5.

30 Este exemplo ilustra transformação de planta para produzir plantas de soja com genes suprimidos.

Um pMON68537 de vetor de transformação é usado para

introduzir um constructo de formação de RNA de filamento duplo de íntron/3'UTR em soja para suprimir os genes de $\Delta 12$ dessaturase, $\Delta 15$ dessaturase, e FATB. O vetor PMON68537 também contém os genes de delta-9 dessaturase (FAB2) e os genes de CP4. O vetor pMON68537 é designado para transformação de planta para suprimir os genes de FAD2, FAD3, e FATB e super-expressar delta-9 dessaturase em soja. Em particular, o constructo compreende um promotor 7S alfa operavelmente ligado ao íntron orientado em sentido de soja e 3'UTRs, isto é, um íntron No. 1 de FAD2-1A, um 3'UTR de FAD3-1A, um 3'UTR de FATB-1, um íntron ligável de formação de alça de grampo, e uma série complementar de íntron orientado em anti-sentido de soja e 3'UTR, isto é, um 3'UTR de FATB-1, um 3'UTR de FAD3-1A e um íntron No. 1 de FAD2-1A e o promotor de FAD2 de soja que direciona a delta-9 dessaturase. O vetor é estavelmente introduzido na soja (variedade Asgrow A4922) por ABI de cepa de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, Patente U.S. No. 6.384.301). O marcador selecionável de CP4 permite as plantas de soja transformadas serem identificadas através de seleção em meios que contêm herbicida de glifosato.

As composições de ácido graxo são analisadas de semente de linhagens de soja transformadas com os constructos de expressão de dsRNAi de intron/3'UTR usando cromatografia de gás. As composições de óleo de semente R1 agrupada e semente R1 única demonstram que as composições de ácido graxo mono- e poliinsaturadas são alteradas no óleo de sementes de linhagens de soja transgênica quando comparadas com aquelas da semente de soja não transformada, (Veja Tabela 3). Por exemplo, a supressão de FAD2 fornece plantas com quantidade aumentada de compostos de éster de ácido oléico; supressão de FAD3 fornece plantas com compostos de éster de ácido linolênico diminuído; e supressão de FATB fornece plantas de compostos de éster graxo saturado reduzido, por exemplo, palmitatos e estearatos. As seleções podem ser feitas de tais linhagens dependendo da composição de ácido graxo relativa desejada. As composições de ácido graxo são analisadas de semente de linhagens de

soja transformadas com constructos usando cromatografia de gás.

Tabela 3. Composição de ácido graxo de sementes únicas de R1 de Eventos de pMON68537

Constructo	Evento	18:1	18:3	16:0	18:0	18:2
PMON68537	GM_A36305	74,92	4,42	6,35	2,93	10,24
PMON68537	GM_A36305	74,8	4,33	6,57	2,93	10,23
PMON68537	GM_A36305	74,43	3,95	5,98	2,82	11,81
PMON68537	GM_A36305	73,32	3,99	6,79	3,24	11,48
PMON68537	GM_A36305	72,87	4,33	7,06	3,08	11,7
PMON68537	GM_A36305	16,63	9,53	13,5	4,06	55,31
PMON68537	GM_A36305	16,52	9,61	13,92	4,24	54,79
PMON68537	GM_A36305	15,67	9,66	13,64	4,19	55,89
PMON68537	GM_A36306	77,45	3,93	6,76	2,47	8,4
PMON68537	GM_A36306	74,51	4,38	6,58	2,47	10,94
PMON68537	GM_A36306	73,21	4,64	7,04	3,08	11,04
PMON68537	GM_A36306	72,78	4,4	6,97	2,55	12,21
PMON68537	GM_A36306	71,67	4,76	6,94	3,25	12,2
PMON68537	GM_A36306	71,01	4,86	7,64	3,05	12,41
PMON68537	GM_A36306	69,72	4,76	7,66	2,95	13,75
PMON68537	GM_A36306	17,41	8,88	13,35	3,85	55,63
PMON68537	GM_A36307	77,22	3,71	6,8	2,77	8,5
PMON68537	GM_A36307	76,79	3,65	6,76	2,85	8,75
PMON68537	GM_A36307	71,44	4,54	7,2	3,58	12,17
PMON68537	GM_A36307	18,83	8,62	13,94	4,02	53,61
PMON68537	GM_A36307	18,81	8,38	13,27	3,7	54,97
PMON68537	GM_A36307	15,68	9,97	14,06	4,55	54,79
PMON68537	GM_A36307	15,28	10,64	14,68	4,43	53,97
PMON68537	GM_A36307	14,08	9,36	14,39	4,31	56,89
PMON68537	GM_A36309	78,67	3,53	6,09	2,5	8,18
PMON68537	GM_A36309	75,43	3,96	6,7	2,53	10,3
PMON68537	GM_A36309	71,41	4,19	6,92	2,74	13,67
PMON68537	GM_A36309	70,51	4,14	6,85	3,16	14,33

Constructo	Evento	18:1	18:3	16:0	18:0	18:2
PMON68537	GM_A36309	67,51	5,01	7,45	3,15	15,69
PMON68537	GM_A36309	66,99	4,92	7,15	3,9	15,79
PMON68537	GM_A36309	20,09	8,46	12,41	5	52,97
PMON68537	GM_A36309	15,15	9,73	14,61	3,85	55,79
PMON68537	GM_A36310	74,28	4,77	7,31	1,85	10,9
PMON68537	GM_A36310	74,03	5,43	8,23	1,63	9,66
PMON68537	GM_A36310	73,07	5,09	7,37	1,76	11,75
PMON68537	GM_A36310	71,83	5,04	7,78	1,86	12,54
PMON68537	GM_A36310	68,01	6,26	9,8	1,97	13,13
PMON68537	GM_A36310	67,22	6,28	8,71	3,28	13,45
PMON68537	GM_A36310	65,37	6,87	10,01	1,94	14,9
PMON68537	GM_A36310	15,76	10,09	13,4	4,28	55,52
PMON68537	GM_A36311	77,87	3,56	5,9	2,46	9,05
PMON68537	GM_A36311	75,8	3,87	5,91	2,93	10,22
PMON68537	GM_A36311	75,61	3,71	6,21	2,56	10,75
PMON68537	GM_A36311	73,68	4,06	6	3,09	11,98
PMON68537	GM_A36311	72,66	4,11	6,41	3,14	12,48
PMON68537	GM_A36311	70,89	4,39	6,52	3,11	13,93
PMON68537	GM_A36311	70,82	3,97	6,52	3,18	14,29
PMON68537	GM_A36311	16,67	9,39	13,65	4,44	54,77
PMON68537	GM_A36312	78,32	4,3	6,36	1,79	8,16
PMON68537	GM_A36312	77,55	4,46	6,51	2,13	8,23
PMON68537	GM_A36312	77,43	4,17	6,31	1,81	9,24
PMON68537	GM_A36312	76,98	4,29	6,25	2,27	9,05
PMON68537	GM_A36312	76,43	4,55	6,82	2,16	8,96
PMON68537	GM_A36312	76,38	4,5	6,46	2,04	9,54
PMON68537	GM_A36312	75,25	4,27	6,41	1,97	11,06
PMON68537	GM_A36312	18,24	9,43	13,6	3,07	54,75
PMON68537	GM_A36313	80,18	4,07	6,17	2,59	5,85
PMON68537	GM_A36313	79,96	4,16	6,03	2,59	6,11
PMON68537	GM_A36313	78,88	3,9	5,6	2,8	7,65

Constructo	Evento	18:1	18:3	16:0	18:0	18:2
PMON68537	GM_A36313	78,76	3,92	5,44	2,91	7,82
PMON68537	GM_A36313	77,64	4,22	5,88	2,9	8,25
PMON68537	GM_A36313	76,15	4,14	6,06	3,13	9,42
PMON68537	GM_A36313	19,05	8,87	13,45	3,71	54,03
PMON68537	GM_A36313	18,47	8,46	13,13	3,63	55,41
PMON68537	GM_A36314	80,27	3,17	5,77	3,4	6,03
PMON68537	GM_A36314	79,66	3,24	5,72	3,19	6,91
PMON68537	GM_A36314	79,5	3,45	5,83	3,23	6,74
PMON68537	GM_A36314	77,42	3,52	5,76	3,57	8,42
PMON68537	GM_A36314	77,33	3,71	6,36	3,34	8,01
PMON68537	GM_A36314	76,83	3,71	6,38	3,24	8,59
PMON68537	GM_A36314	16,6	9,3	12,63	4,43	55,99
PMON68537	GM_A36314	15,26	8,59	13,71	4,54	56,84
PMON68537	GM_A36315	20,21	8,25	13,61	3,59	53,37
PMON68537	GM_A36315	17,47	9,22	13,46	3,35	55,57
PMON68537	GM_A36315	16,75	9,3	13,61	3,66	55,75
PMON68537	GM_A36315	16,54	9,18	13,54	3,88	55,9
PMON68537	GM_A36315	16,06	10,07	13,44	4,01	55,42
PMON68537	GM_A36315	16,05	9,58	12,82	4,25	56,29
PMON68537	GM_A36315	15,95	10,42	13,12	3,63	55,91
PMON68537	GM_A36315	15,5	10,22	13,25	3,78	56,3
PMON68537	GM_A36316	79,61	3,56	5,79	2,94	6,87
PMON68537	GM_A36316	75,11	4,01	6,45	3,44	9,76
PMON68537	GM_A36316	75,07	4,25	6,74	3,09	9,64
PMON68537	GM_A36316	73,92	3,97	6,53	3,56	10,75
PMON68537	GM_A36316	17,26	9,59	13,1	4,26	54,78
PMON68537	GM_A36316	17,15	9,03	12,81	4,04	55,97
PMON68537	GM_A36316	16,62	9,2	13,15	3,99	56,03
PMON68537	GM_A36316	16,6	9,44	13,19	3,95	55,84
PMON68537	GM_A36317	18,96	7,55	13,2	3,75	55,51
PMON68537	GM_A36317	16,19	9,43	13,33	3,96	56,04

Constructo	Evento	18:1	18:3	16:0	18:0	18:2
PMON68537	GM_A36317	16,05	9,1	14,02	3,94	55,91
PMON68537	GM_A36317	15,33	9,4	13,91	4,22	56,11
PMON68537	GM_A36317	15,28	9,2	13,87	4,27	56,36
PMON68537	GM_A36317	14,58	10,15	13,74	4,38	56,15
PMON68537	GM_A36317	13,95	9,47	13,98	4,76	56,79
PMON68537	GM_A36317	13,91	9,88	14,26	4,62	56,25
PMON68537	GM_A36318	78,82	3,64	5,7	2,77	7,87
PMON68537	GM_A36318	77,94	3,73	5,9	2,94	8,29
PMON68537	GM_A36318	75,18	4,11	6,08	3,48	9,95
PMON68537	GM_A36318	75,1	3,93	6,02	3,04	10,75
PMON68537	GM_A36318	75,01	4,22	6,57	3,29	9,72
PMON68537	GM_A36318	74,17	4,2	6,51	3,27	10,68
PMON68537	GM_A36318	73,47	4,27	6,7	3,22	11,16
PMON68537	GM_A36318	30,57	10,54	14,83	5,55	36,92
PMON68537	GM_A36319	80	3,65	5,83	2,31	7,02
PMON68537	GM_A36319	79,89	3,65	5,64	2,35	7,26
PMON68537	GM_A36319	79,4	3,59	5,73	1,76	8,46
PMON68537	GM_A36319	78	3,87	6,11	2,35	8,5
PMON68537	GM_A36319	76,08	4,22	6,5	2,35	9,74
PMON68537	GM_A36319	75,56	3,89	6,41	1,78	11,3
PMON68537	GM_A36319	75,26	4,27	6,47	2,37	10,5
PMON68537	GM_A36319	75,16	4,1	6,48	2,49	10,66
PMON68537	GM_A36320	81,27	3,19	5,84	2,4	6,09
PMON68537	GM_A36320	80,21	3,27	5,18	2,44	7,76
PMON68537	GM_A36320	79,64	3,38	5,5	2,67	7,63
PMON68537	GM_A36320	79,46	3,38	5,82	2,67	7,42
PMON68537	GM_A36320	78,5	3,59	6,24	2,49	8
PMON68537	GM_A36320	73,83	3,79	6,72	2,78	11,74
PMON68537	GM_A36320	73,1	3,95	6,9	2,39	12,48
PMON68537	GM_A36320	22,99	8,03	12,19	4,81	50,89
PMON68537	GM_A36324	75,93	3,77	6,58	2,76	9,76

Constructo	Evento	18:1	18:3	16:0	18:0	18:2
PMON68537	GM_A36324	75,1	4,05	7,01	2,83	9,8
PMON68537	GM_A36324	17,83	8,79	12,78	4,11	55,49
PMON68537	GM_A36324	16,46	8,88	12,84	4,48	56,29
PMON68537	GM_A36324	16,35	9,25	13,51	4,17	55,66
PMON68537	GM_A36324	15,25	8,99	13,73	4,28	56,69
PMON68537	GM_A36324	14,16	10,17	13,95	4,11	56,58
PMON68537	GM_A36324	13,59	9,87	14,61	4,5	56,33
PMON68537	GM_A36357	80,19	3,03	5,59	3,2	6,62
PMON68537	GM_A36357	79,78	3,19	5,51	3,24	6,89
PMON68537	GM_A36357	78,5	3,55	5,75	3,17	7,71
PMON68537	GM_A36357	77,48	3,68	5,71	3,55	8,23
PMON68537	GM_A36357	77,28	3,79	5,66	3,48	8,46
PMON68537	GM_A36357	77,1	3,51	5,43	3,65	8,99
PMON68537	GM_A36357	71,9	4,24	6,47	3,67	12,39
PMON68537	GM_A36357	17,66	9,32	13,26	4,21	54,51
PMON68537	GM_A36359	77,91	3,35	5,67	3,24	8,53
PMON68537	GM_A36359	77,85	3,29	5,42	3,29	8,87
PMON68537	GM_A36359	76,71	3,65	6,07	3,35	8,95
PMON68537	GM_A36359	71,73	4,01	6,79	3,49	12,68
PMON68537	GM_A36359	69,32	4,51	6,99	3,66	14,13
PMON68537	GM_A36359	68,63	4,44	6,91	3,76	14,89
PMON68537	GM_A36359	18,87	8,03	13,38	3,86	54,81
PMON68537	GM_A36359	16,81	9,83	13,08	4,68	54,55
PMON68537	GM_A36360	79,34	3,29	5,99	3,15	6,88
PMON68537	GM_A36360	75,42	3,47	6,47	3,08	10,26
PMON68537	GM_A36360	75,3	3,86	6,69	3,2	9,64
PMON68537	GM_A36360	74,51	3,8	6,39	3,32	10,67
PMON68537	GM_A36360	21,49	6,95	13,07	3,92	53,46
PMON68537	GM_A36360	20,05	7,4	13,09	3,83	54,57
PMON68537	GM_A36360	16,08	9,14	13,02	4,64	56,03
PMON68537	GM_A36360	15,86	9,07	13,44	4,49	56,04

Constructo	Evento	18:1	18:3	16:0	18:0	18:2
PMON68537	GM_A36361	82,13	2,83	5,67	3,13	4,81
PMON68537	GM_A36361	80,99	3,2	5,79	3,01	5,64
PMON68537	GM_A36361	74,39	3,85	6,33	3,5	10,59
PMON68537	GM_A36361	18,01	8,46	13,18	3,92	55,41
PMON68537	GM_A36361	17,99	8,11	13,05	4,09	55,7
PMON68537	GM_A36361	17,35	8,31	13,4	4	55,88
PMON68537	GM_A36361	16,81	10,2	12,9	4,32	54,87
PMON68537	GM_A36361	16,55	8,5	13,21	4,22	56,45
PMON68537	GM_A36362	78,05	3,89	6,29	2,81	7,76
PMON68537	GM_A36362	76,89	3,69	6,32	3,12	8,76
PMON68537	GM_A36362	76,1	4	6,57	3,02	9,24
PMON68537	GM_A36362	76,01	4,08	6,24	3,03	9,48
PMON68537	GM_A36362	75,86	3,76	5,68	3,56	9,95
PMON68537	GM_A36362	75,79	4,07	6,43	3,15	9,34
PMON68537	GM_A36362	74,89	4,14	6,63	3,11	10,07
PMON68537	GM_A36362	17,22	8,8	13,75	3,77	55,54
PMON68537	GM_A36363	79,15	3,57	6,2	3,03	6,84
PMON68537	GM_A36363	75,69	3,83	7,07	2,73	9,53
PMON68537	GM_A36363	73,97	4,22	6,82	3,39	10,33
PMON68537	GM_A36363	72,53	4,31	6,64	3,7	11,59
PMON68537	GM_A36363	68,42	4,5	7,05	3,95	14,79
PMON68537	GM_A36363	18,39	8,7	13,61	4,1	54,28
PMON68537	GM_A36363	17,54	8,87	14,08	4,07	54,56
PMON68537	GM_A36363	15,87	9,66	14,56	4,2	54,69
PMON68537	GM_A36365	78,79	3,11	5,87	1,27	9,9
PMON68537	GM_A36365	76,76	3,86	5,79	1,66	10,91
PMON68537	GM_A36365	75,41	3,49	6,06	1,83	12,15
PMON68537	GM_A36365	73,57	3,65	6,11	1,5	14,19
PMON68537	GM_A36365	71,55	3,56	6,62	1,24	16,08
PMON68537	GM_A36365	70,41	4	6,07	2,15	16,33
PMON68537	GM_A36365	66,66	3,9	6,84	1,5	20,21

Constructo	Evento	18:1	18:3	16:0	18:0	18:2
PMON68537	GM_A36365	63,96	4,22	7,08	2,27	21,52
PMON68537	GM_A36366	75,44	4,33	6,49	3,21	9,32
PMON68537	GM_A36366	74,75	4,21	6,87	2,71	10,33
PMON68537	GM_A36366	74,69	4,65	6,91	3,06	9,65
PMON68537	GM_A36366	73,23	4,89	7,23	2,99	10,52
PMON68537	GM_A36366	72,53	4,76	7,42	3,26	10,85
PMON68537	GM_A36366	67,15	5,05	7,47	3,33	15,87
PMON68537	GM_A36366	65,81	5,6	7,9	3,37	16,09
PMON68537	GM_A36366	62,31	6,19	8,71	3,22	18,55
PMON68537	GM_A36367	80,56	3,3	6,07	2,58	6,34
PMON68537	GM_A36367	77,78	3,58	6,47	2,66	8,45
PMON68537	GM_A36367	77,78	3,46	6,25	2,84	8,51
PMON68537	GM_A36367	77,39	3,81	6,71	2,86	8,11
PMON68537	GM_A36367	77,32	3,74	6,17	3,12	8,47
PMON68537	GM_A36367	75,93	3,97	6,23	3,43	9,29
PMON68537	GM_A36367	72,82	4,09	6,85	3,25	11,88
PMON68537	GM_A36367	19,31	7,58	13,7	3,59	55
PMON68537	GM_A36410	21,67	7,62	13,38	3,43	53,1
PMON68537	GM_A36410	20,9	8,33	12,93	3,64	53,33
PMON68537	GM_A36410	20,21	8,04	13,28	3,86	53,66
PMON68537	GM_A36410	20,02	8,71	12,79	3,71	53,87
PMON68537	GM_A36410	18,96	8,95	13,3	3,77	54,15
PMON68537	GM_A36410	18,18	8,98	13,56	3,74	54,66
PMON68537	GM_A36410	17,61	9,29	12,93	4,12	55,13
PMON68537	GM_A36410	16,78	9,8	13,78	3,92	54,83
PMON68537	GM_A36411	75,06	4,33	6,49	2,93	10,08
PMON68537	GM_A36411	74,32	4,46	6,76	2,96	10,38
PMON68537	GM_A36411	73,41	4,76	6,91	3,11	10,78
PMON68537	GM_A36411	73,24	4,87	7,28	2,89	10,67
PMON68537	GM_A36411	22,38	8,17	13,47	3,6	51,51
PMON68537	GM_A36411	18,26	9,07	14,14	3,81	54,02

Constructo	Evento	18:1	18:3	16:0	18:0	18:2
PMON68537	GM_A36411	17,52	10,1	13,1	4,03	54,36
PMON68537	GM_A36411	17,02	9,71	13,45	4,02	54,89
A3244	A3244	18,29	7,79	13,69	4,15	55,08
A3244	A3244	17,54	8,19	13,32	4,32	55,57
A3244	A3244	17,13	8,13	13,21	4,46	56,04
A3244	A3244	15,47	9,56	13,04	4,43	56,46
A3244	A3244	15,17	8,95	13,79	4,3	56,78
A3244	A3244	15,05	9,03	14,16	4,01	56,8
A3244	A3244	13,51	10,07	12,95	5,07	57,3
A3244	A3244	13,49	9,91	13,31	4,56	57,67

Exemplo 6. Constructo de dsRNAi de FAD2-1/FATB em soja transgênica

O constructo de pMON95829 como descrito no Exemplo 3D é usado para introduzir um íntron de FAD2-1, FATB, constructo de formação de RNA de filamento duplo em soja para suprimir o gene FAD2 e gene FATB. O vetor é estavelmente introduzido em soja (variedade de Asgrow A4922) por ABI de cepa de *Agrobacterium tumefaciens* (Martinell, Patente U.S. No. 6.384.301). O marcador selecionável CP4 permite que as plantas de soja transformadas sejam identificadas através de seleção em meios contendo herbicida de glifosato. Subseqüentemente, os genomas de plantas transformadas são avaliados para inserção tandem simultânea do primeiro T-DNA e do segundo T-DNA, isto é na montagem da "borda direita para borda direita". A avaliação é feita com métodos de mapeamento de hibridização do Sul. As plantas de soja transformadas contendo a configuração preferida no seu genoma são transferidas para uma estufa para produção de semente.

Por exemplo, tecido de folha foi tomado das plantas R0 transformadas com constructo pMON95829 e análise do Sul é realizada. As sondas e digestões de enzima de restrição são escolhidas para identificar eventos que contêm uma montagem de borda-direita-borda-direita ("RB-RB") de ambos os T-DNAs. Tipicamente, cerca de 25% de todos os transformantes tem T-DNAs de RB-RB apropriadamente montados.

As composições de ácido graxo são analisadas de semente de linhagens de soja transformadas com uma constructo de pMON95829 usando cromatografia de gás como descrito no Exemplo 4 para identificar ésteres de metila de compostos de ácido graxo extraídos de sementes.

- 5 Primeiro, seis sementes R1 tomadas de plantas de soja transformadas com constructo de pMON95829 são colhidas, e a composição de ácido graxo de cada semente única é determinada. Por conseguinte as plantas R1 de cada evento estão segregando para os transgenes e, portanto, produzem sementes com composição de soja convencional, como também versões
- 10 modificadas. As sementes positivas são agrupadas e pesadas para cada evento. As médias positivas agrupadas demonstram que as composições de ácido graxo mono- e poliinsaturadas são alteradas no óleo de sementes de linhagens de soja transgênica quando comparadas com aquelas da semente de soja não transformada (Veja Tabela 4). Por exemplo, a supressão de
- 15 FAD2 fornece plantas com quantidade aumentada de compostos de éster de ácido oléico e supressão de FATB fornece plantas com compostos de éster graxo saturado reduzido, por exemplo, palmitatos e estearatos.

Tabela 4. Composição de ácido graxo de sementes únicas R1 de eventos de pMON95829.

Construção	No. Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON95829	GM_A94247	2,1	2,8	83,0	6,0	5,5
PMON95829	GM_A94296	2,6	2,9	80,6	7,1	5,8
PMON95829	GM_A93590	2,5	2,8	80,4	7,4	5,8
PMON95829	GM_A93437	2,6	2,8	79,8	7,9	6,0
PMON95829	GM_A93517	2,9	2,8	79,5	7,7	6,0
PMON95829	GM_A93647	2,3	3,0	78,6	9,0	6,5
PMON95829	GM_A93670	3,1	2,9	77,3	10,1	6,2
PMON95829	GM_A92396	2,9	2,6	76,0	11,1	7,0
PMON95829	GM_A92455	3,6	3,1	74,9	12,0	5,5
PMON95829	GM_A93678	2,8	3,4	74,0	11,9	7,4
PMON95829	GM_A93640	2,5	2,7	71,6	14,6	7,6
PMON95829	GM_A94937	4,5	3,3	67,2	17,7	7,1

PMON95829	GM_A92481	4,9	2,8	58,1	25,3	8,1
PMON95829	GM_A94306	3,1	3,2	55,9	29,0	7,9
PMON95829	GM_A94211	3,0	2,7	47,0	38,3	8,7

Exemplo 7

pMON93505 é um constructo usado para montagem in vivo e tem dois segmentos de T-DNA, cada flanqueado por elementos de borda de T-DNA de Agrobactéria, isto é DNA de borda direita (RB) e DNA de borda esquerda (LB). O primeiro segmento de T-DNA contém um promotor 7S α ' de soja operavelmente ligado a um íntron 1 de FAD2-1A de soja (SEQ ID NO: 1) que é reduzido em 100 nucleotídeos contíguos do terminal 3' e ligado ao 3'UTR de FATB-1a seguidos por um 5' UTR de FATB-1a, um gene de KAS IV C. pulcherrima (SEQ ID NO: 39) operavelmente ligando-se a um promotor de Brassica napin e uma seqüência terminação 3' de Brassica napin, um gene de delta 9 dessaturase Ricinus communis (Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 2003/00229918 A1) operavelmente ligando-se a um promotor 7S α de soja e uma seqüência de terminação 3' nos, e um gene de EPSPS de CP4 que operavelmente se liga a um promotor eFMV e uma seqüência de terminação 3' de ervilha Rubisco E9 tudo flanqueado por elementos de borda de T-DNA de Agrobactéria, isto é DNA de borda direita (RB) e DNA de borda esquerda (LB). No mesmo constructo, no segundo segmento de T-DNA, flanqueado por outro RB e LB, está uma seqüência de terminação 3' H6 operavelmente ligando-se a um íntron 1 de FAD2-1A de soja (SEQ ID NO: 1) que é reduzido em 100 nucleotídeos contíguos do terminal 3' e ligado ao 3' UTR de FATB-1A seguido por um 5' UTR de FATB-1a.

O constructo de pMON93505 é estavelmente introduzido em soja (variedade de Asgrow A4922) por ABI de cepa de Agrobacterium tumefaciens (Martinell, Patente U.S. No. 6.384.301). O marcador selecionável de CP4 permite que a planta de soja transformada seja identificada através de seleção em meios que contêm herbicida de glifosato. Subseqüentemente, os genomas de plantas transformadas são avaliados quanto à inserção tandem simultânea do primeiro T-DNA e do segundo T-

DNA, isto é na montagem de "borda direita para borda direita". A avaliação é feita com métodos de mapeamento de hibridização do sul. As plantas de soja transformadas contendo a configuração preferida no seu genoma são transferidas para uma estufa para produção de semente.

- 5 Por exemplo, o tecido de folha foi tomado das plantas R0 transformadas com constructo de pMON93505 e a análise do Sul é realizada. As sondas e digestões de enzima de restrição são escolhidas para identificar eventos que contêm uma montagem de borda-direita- borda-direita ("RB-RB") de ambos os T-DNAs. Tipicamente, aproximadamente 25%
10 de todo o transformante tem T-DNAs de RB-RB apropriadamente montados.

- As composições de ácido graxo são analisadas de semente de linhagens de soja transformadas com um constructo de pMON93505 usando cromatografia de gás como descrito no Exemplo 4 para identificar ésteres de metila de compostos de ácido graxo de sementes. Primeiro, seis sementes
15 R1 tomadas de plantas de soja transformadas com constructo de pMON93505 são colhidas, e a composição de ácido graxo de cada semente única é determinada. Por conseguinte, as plantas R1 de cada evento estão segregando para os transgenes e, portanto, produzem as sementes com composição de soja convencional, como também versões modificadas. As
20 sementes positivas são agrupadas e pesadas para cada evento. As médias positivas agrupadas demonstram que as composições de ácido graxo de mono- e poliinsaturado são alteradas no óleo de sementes de linhagens de soja transgênica quando comparadas com aquelas da semente de soja não transformada (Veja Tabela 10). Por exemplo, a supressão de FAD2 fornece
25 plantas com quantidade aumentada de compostos de éster de ácido oléico. Por exemplo, a supressão de FAD2 fornece plantas com quantidade aumentada de compostos de éster de ácido oléico, supressão de FAD3 fornece plantas com compostos de éster de ácido linolênico reduzido, e supressão de FATB fornece plantas de compostos de éster graxo saturado
30 reduzido, por exemplo palmitatos e estearatos.

Tabela 5. Composição de ácido graxo de sementes únicas de R1 de eventos de pMON93505

Construção	No. de Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON93505	GM_A87814	1,3	1,0	84,9	5,5	6,3
PMON93505	GM_A86449	1,5	0,9	84,9	4,9	6,8
PMON93505	GM_A86032	1,5	1,1	83,5	6,3	7,0
PMON93505	GM_A86159	1,5	0,9	82,8	6,7	7,5
PMON93505	GM_A86178	1,7	1,0	82,5	6,7	7,3
PMON93505	GM_A86075	1,4	0,9	81,4	6,6	8,5
PMON93505	GM_A86303	1,0	0,6	81,4	7,4	8,8
PMON93505	GM_A86454	1,4	0,9	79,9	7,4	8,8
PMON93505	GM_A86799	1,4	1,1	79,4	9,6	7,7
PMON93505	GM_A85997	2,2	2,5	79,3	7,7	7,4
PMON93505	GM_A86058	1,8	1,0	76,8	11,3	8,3
PMON93505	GM_A86274	1,2	0,7	74,6	10,2	11,9
PMON93505	GM_A86325	1,1	0,7	72,8	15,4	9,2
PMON93505	GM_A85969	2,0	0,7	70,7	13,6	12,1
PMON93505	GM_A86033	1,7	0,9	69,1	18,2	9,5
PMON93505	GM_A86372	1,7	1,0	65,7	12,6	17,6
PMON93505	GM_A86403	1,5	0,9	64,6	16,8	15,4
PMON93505	GM_A87803	1,1	0,6	57,7	26,0	13,8
PMON93505	GM_A86036	3,1	1,5	54,8	30,4	9,7
PMON93505	GM_A86269	4,9	1,8	51,4	31,9	9,5

Exemplo 8. Sojas Transgênicas com Composições de Ácido Graxo Alteradas

pMON97563 contém um promotor de 7S α ' de soja operavelmente ligado a um íntron 1 de FAD2-1A de soja (SEQ ID NO: 1) que é reduzido em 100 nucleotídeos contíguos do terminal 3' e ligado a um

5 5'UTR de FAD3-1A, seguido por um 3'UTR de FAD3-1A, ligado a um 5'UTR de FAD3-1B, seguido por um 3'UTR de FAD3-1B, ligado a um 5'UTR de FAD3-1C, seguiu por um 3'UTR de FAD3-1C, seguido por uma região de codificação de CTP de FATB-1a, seguido por uma região de codificação de CTP de FATB-2a operavelmente ligando-se a 70 nucleotídeos de íntron 4 de

10 FAD3-1A, operavelmente ligando-se a uma região de codificação de CTP de

FATB-2a na orientação de anti-sentido seguido por uma região de codificação de CTP de FATB-1a na orientação de anti-sentido, ligado a um 3'UTR de FAD3-1C em anti-sentido, seguido por um 5'UTR de FAD3-1C em anti-sentido, ligado a um 3'UTR de FAD3-1B em anti-sentido, seguido por um 5'UTR de FAD3-1B em anti-sentido, ligado a um 3'UTR de FAD3-1A em anti-sentido, seguido por um 5'UTR de FAD3-1A em anti-sentido, seguido por um íntron 1 de FAD2-1A de soja (SEQ ID NO: 1) que é reduzido em 400 nucleotídeos contíguos do terminal 3' e na orientação de anti-sentido, operavelmente ligado a um segmento de poliadenilação 3' H6 que com um gene de EPSPS de CP4 operavelmente ligando-se a um promotor de eFMV e uma sequência de terminação 3' de ervilha Rubisco E9 tudo flanqueado por RB e LB na mesma molécula de DNA. O constructo de expressão de gene resultante é usada para transformação de planta que usa métodos como descrito aqui. As composições de ácido graxo são determinadas de semente de linhagens de soja transformadas com este constructo usando cromatografia de gás como descrito no Exemplo 4. A Tabela 26 determina as composições de sementes representativas. O nível de 18:3 é reduzido para aproximadamente 1%.

Tabela 6. Composição de ácido graxo de sementes únicas R1 de eventos de pMON97563

Constructo	Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
PMON97563	GM_A109156	2,21	2,78	85,05	8,48	0,69
PMON97563	GM_A109196	2,07	2,31	84,4	9,42	0,97
PMON97563	GM_A109207	2,24	2,78	83,98	9,36	0,82
PMON97563	GM_A103543	2,21	2,63	83,94	10,28	0,95
PMON97563	GM_A103547	2,06	2,47	83,67	10,47	0,89
PMON97563	GM_A109146	1,71	2,34	81,14	13,71	0,91
PMON97563	GM_A109155	2,33	2,7	80,76	12,28	1,11
PMON97563	GM_A109164	2,07	2,61	78,8	14,6	1
PMON97563	GM_A109170	2,68	1,95	78,78	14,14	1,55
PMON97563	GM_A109277	2,49	3,19	78,19	14,51	0,93
PMON97563	GM_A109194	2,46	2,81	76,62	16,26	0,92

PMON97563	GM_A109177	2,56	2,49	72,64	20,14	1,44
PMON97563	GM_A109201	2,46	2,9	72,21	20,13	1,11
PMON97563	GM_A103550	2,18	2,67	70,84	22,25	1,17
PMON97563	GM_A109203	2,18	2,81	69,93	22,91	0,98

Exemplo 9. Cruzamentos de soja transgênica meio oléica com soja pouco linolênica

Uma planta de soja de uma linhagem com sementes que têm níveis moderados de ácido oléico é cruzada com uma planta de uma
5 linhagem com níveis normais de ácido oléico porém cerca de 2,8% de ácido linolênico (18:3). Este cruzamento resulta em uma linhagem de soja que produz óleo com as propriedades combinadas, ácido meio oléico e ácido pouco linolênico.

Resumidamente, a reprodução de planta foi realizada como
10 descrito abaixo. Uma linhagem origem, uma linha de soja transgênica, evento GM_A22234 rotulado, contém o pMON68504 de plasmídeo em um cromossomo. pMON68504 é um constructo de 2T-DNA tendo um promotor 7S operavelmente ligado a um íntron No. 1 de FAD2-1A (SEQ ID NO: 2; Publicação PCT WO 2001014538) em orientação de sentido para
15 parcialmente suprimir o gene FAD2 endógeno e um gene marcador selecionável de CP4. O óleo extraído das sementes desta linhagem contém aproximadamente 65% de ácido oléico, acima dos 20% de óleo de soja convencional (veja, Tabela 25). Outra linhagem origem é uma variedade não transgênica 6p248-5 (linhagem C1640) que tem um conteúdo de ácido
20 linolênico de cerca de 3% em peso de ácidos graxos totais em suas sementes, quando comparado ao 8-9% de ácido linolênico convencional encontrado em óleo de soja normal (veja, Tabela 25). A redução em ácido linolênico é causada por um mutante duplo fad3-1b-/fad3-1c-. (Veja Wilcox, J.R. e J.F. Cavins, Inheritance of low linolenic acid content of the seed of a
25 mutant of Glycine max., Theoretical and Applied Genetics 71: 74-78, 1985).

As plantas da linhagem transgênica GM_A22234 (usadas como fêmea) e a linhagem mutante 6p248-5 (usada como o macho) foram cruzadas. Trinta sementes F1 foram produzidas e plantadas para produzir

1kg (2,3 lbs) de sementes F2 fertilizadas de modo cruzado contínuo. As sementes homozigoto triplas putativas foram identificadas de 200 sementes F2 por análise de metil-éster de ácido graxo de semente única (FAME) de lascas de semente. Vinte e sete sementes com cerca de 60% de 18:1, cerca de 20% de 18:2, e cerca de 2-3% de 18:3 foram identificadas e plantadas para produzir sementes F3 fertilizadas de modo cruzado contínuo.

Para análise do marcador, as amostras de tecido de folha F2 foram coletadas e marcadores moleculares estabelecidos para os alelos mutantes de FAD3 foram usados para identificar as plantas positivas duplas (plantas que têm ambas as mutações de FAD3-1B e FAD3-1C). Três genótipos foram direcionados para recuperação desta experiência: 1) mutantes homozigotos fad3-1b - / fad3-1c-duplos; 2) plantas homozigoto únicas para o fad3-1c-alelo sozinho; e 3) homozigoto único para fad3-1b-alelo sozinho.

As plantas F2 foram plantas únicas colhidas, e as 10 subamostras de semente F3 foram analisadas. De 27 sementes com cerca de 60% de 18:1 (ácido oléico), cerca de 20% de 18:2 (ácido linoléico), e cerca de 2-3% de 18:3 (ácido linolênico), 5 plantas foram identificadas como mutante de FAD3 duplo putativo e foram aumentadas juntas para crescimento adicional. A Tabela 25 resume os dados da composição de semente F3 de 120 plantas F2.

Tabela 7. Composição de ácido graxo de semente F3 empilhada mutante fad3/fenótipo de ácido meio oléico

GOI	Ácido Graxo, % em mol Relativo				
	18:1	16:0	18:0	18:2	18:3
Meio oléico (GM_A22234), fad3-1b-, Fad3-1c- (6p248-5)	74,3	9,08	3,65	7,89	1,91
Mutante Origem fad3-1b-, Fad3-1c- (6p248-5)	30,5	12,3	3,61	50,90	2,3
~65% meio oléico origem (GM_A22234)	64,6	9,4	3,61	14,53	7,27

A linhagem de ácido meio oléico tripla fad3-1b-, fad3-1c-,

(GM_AA22234) tem 1,9% de 18:3 linolênico e 74,3% de ácido oléico. A combinação de mutantes fad3-1b- e fad3-1c- com o local transgênico meio oléico (GM_AA22234) leva à outra redução de linolênico e aumento de oléico relativo às linhagens origens respectivas.

5 Para avaliar a eficácia de campo da linhagem meio oléica tripla fad3-1b-, fad3-1c- (GM_AA22234), as entradas de pilha de reprodução foram plantadas em um projeto de bloco de grupo com as pilhas e controles origens agrupados e aleatorizados no bloco de teste, e as amostras de semente foram analisadas. Um perfil de ácido graxo para a pilha meio oléica
10 tripla fad3-1b-, fad3-1c- (GM_AA22234) foi gerado com semente crescida no campo F4 que usa FAME de semente única. O perfil de ácido graxo F4 demonstrou aproximadamente 68% de 18:1, 13% de saturados totais, 16% de 18:2 e 2,3% de 18:3. Os níveis de proteína e óleo foram similares às linhagens origem.

15 Exemplo 10. Cruzamentos de soja transgênica pouco saturada, meio oléica com soja pouco linolênica

 Uma planta de soja de uma linhagem com sementes que tem nível pouco saturado e ácido meio oléico em seu óleo é cruzada com uma planta de uma linhagem com níveis saturados e oléicos normais porém
20 cerca de 2,8% de ácido linolênico (18:3). Este cruzamento resulta em uma linhagem de soja que produz óleo com as propriedades combinadas, níveis de ácido graxo meio oléico, pouco saturado e pouco linolênico.

 Resumidamente, a reprodução de planta foi realizada como descrito abaixo. Uma linhagem origem é uma linhagem de soja transgênica
25 que abriga DNA recombinante para supressão parcial dos genes FAD2-1 e FATB endógenos como também um gene de marcador selecionável de CP4 que torna a planta tolerante ao glifosato. O óleo extraído das sementes desta linhagem contém aproximadamente 55-85% de ácido oléico, acima dos 20% de óleo de soja convencional. Também contém menos do que 8% de ácidos
30 graxos saturados (16:0 mais 18:0), reduzido dos 14-16% convencionais de óleo de soja normal. Outra linhagem origem é uma variedade não transgênica 6p248-5 (linhagem C1640) que tem cerca de 3% de níveis de

ácido linolênico em suas sementes, quando comparado aos 8-9% de ácido linolênico convencional encontrado em óleo de soja normal. A redução em ácido linolênico é causada por um mutante *fad3-1b-/fad3-1c-duplo*. (Veja Wilcox, J.R. e J.F. Cavins, Inheritance of low linolenic acid content of the seed of a mutant of *Glycine max.*, Theoretical and Applied Genetics 71: 74-78, 1985.)

As plantas da linhagem transgênica meio - muito oléica/pouco saturada são cruzadas com plantas da linhagem de mutante 6p248-5. As sementes F1 são produzidas e plantadas para produzir semente F2 fertilizada de modo cruzado contínuo. As sementes homozigoto triplas putativas são identificadas de sementes F2 por análise de metil-éster de ácido graxo de semente única (FAME) de lascas de semente. As sementes com características de óleo combinadas são identificadas e plantadas para produzir sementes F3 fertilizadas de modo cruzado contínuo. Para análise de marcador, as amostras de tecido de folha F2 são coletadas e os marcadores moleculares estabelecidos para os alelos mutantes FAD3 são usados para identificar plantas positivas duplas (plantas que têm ambas deleções de FAD3). Os lotes de semente F3 que indicam homozigosidade para o local de transgene como também as duas mutações de FAD3 são selecionados e usados para estabelecimento de linhagem.

Para avaliar a eficácia de campo das linhagens *fad3-1b-*, *fad3-1c-*, meio oléicas/pouco saturadas, as entradas de pilha de reprodução são plantadas em um projeto de bloco de grupo com as pilhas e controles origens agrupados e aleatorizados no bloco de teste, e as amostras de semente são analisadas. Um perfil de ácido graxo para a pilha tripla *fad3-1b-*, *fad3-1c-*, meio oléica/pouco saturada é determinado com semente crescida em campo F4 usando FAME de semente única. O perfil de ácido graxo F4 mostra 55-85% de 18:1, menos do que 8% de saturados, e 2-3% de 18:3. Os níveis de óleo e proteína são similares às linhagens origens.

Exemplo 11. Uso de Polimorfismos em FAD3-1b

Para praticar os métodos da invenção, os polimorfismos associados com o gene FAD3-1B de soja podem ser usados para identificar

a presença de regiões genômicas de soja associadas com certos fenótipos de ácido pouco linolênico. Um polimorfismo de nucleotídeo único em uma posição que corresponde à posição 2021 de SEQ ID NO:61 é detectado entre todas as linhagens em um comprimento de sequência inteiro de 2683

5 pares de base (Tabela 3) e é associado com um fenótipo de ácido pouco linolênico. A linhagem pouco linolênica 6P248, T27111, T27190, T26767 e T26830 carrega um alelo "C" nesta posição ao mesmo tempo em que todas as outras linhagens carregam um "T". Conseqüentemente, a presença de um alelo "C" pode ser usada para identificar a presença das regiões

10 genômicas de soja pouco linolênicas em cruzamentos onde o germplasma pouco linolênico derivado de 6P248, T27111, T27190, T26767 e T26830 é usado. Outras linhagens pouco linolênicas tal como A5, Soyola, e N98-4445 carregam um alelo tipo silvestre neste lugar, indicando que um ou mais outros lugares contribuem com o fenótipo pouco linolênico nas linhagens de

15 A5, Soyola, e N98-4445.

Tabela 8. Polimorfismos no lugar de FAD3-1B

	Linhagens	Posição 2021 de SEQ ID NO:61
	Orig seq	C
	6P248	T
20	T27111	T
	T27190	T
	T26767	T
	T26830	T
	A5	C
25	C1640	C
	Soyola	C
	N98-4445	C
	A2247	C
	AG1701	C
30	AG1902	C
	AG2402	C
	AG2703	C

	AG3201	C
	AG3302	C
	AG3702	C
	AJB2102J0C	C
5	AJB2302K0C	C
	CSR2533	C
	CSR2622N	C
	CSR3922N	C
	DKB19-51	C
10	DKB23-95	C
	WP25920	C

Exemplo 12. Identificação de Polimorfismos no gene FAD3-1C

Para praticar os métodos da invenção, são usados polimorfismos associados com o gene FAD3-1C de soja para identificar a presença de regiões genômicas de soja associadas com certos fenótipos de ácido pouco linolênico. Quatro SNPs e um indel (inserção/deleção) são identificados em FAD3-1C que é associado com certos fenótipos de ácido pouco linolênico (Tabela 4). Os SNPs que correspondem às posições 687, 2316, 3743, como também o indel em 1129 de SEQ ID NO:62 são associados com o fenótipo pouco linolênico. As linhagens pouco linolênicas, Soyola e N98-4445 carregam um alelo diferente nas posições 687 e 1129 de todas as outras linhagens.

As linhagens de mutante 6P248, T27111, T27190, T26767, T26830 e A5 deixarão de amplificar com certos iniciadores específicos de lugar de FAD3-1C uma vez que há uma deleção grande no lugar de FAD3-1C nestas linhagens. A falha destas regiões a serem amplificadas, acopladas com reações de controle positivas apropriadas (isto é, usando DNA genômico de soja que contém um gene FAD3-1C intacto com iniciadores de FAD3-1C da região deletada como também uso de iniciadores para outros genes de não FAD3-1C com o DNA genômico de soja da deleção de FAD3-1C), é diagnóstico para deleções de FAD3-1C.

Tabela 9. Polimorfismos no lugar de FAD3-1C

Posição da Seqüência

Linhagens	687	1129	1203	2316	3292	3360	3743
6P248	NA	NA	NA	N/A			
T27111	NA	NA	NA	N/A			
T27190	NA	NA	NA	N/A			
T26767	NA	NA	NA	N/A			
T26830	NA	NA	NA	N/A			
A5	NA	NA	NA	T			
C1640	T	*	A				
Soyola	C	T	A	T	C	A	A
N98-4445	C	T	A				
A2247	T	*	A	G	T	*	*
AG1701	T	*	A	G	T	*	*
AG1902	T	*	A	T	*	*	
AG2402	T	*	A	G	T	*	*
AG2703	T	*	A				
AG3201	T	*	G				
AG3302	T	*	A				
AG3702	T	*	A				
AJB2102J0C	T	*	A				
AJB2302K0C	T	*	A				
CSR2533	T	*	A				
CSR2622N	T	*	G				
CSR3922N	T	*	A				
DKB19-51	T	*	A				
DKB23-95	T	*	A				
WP25920	T	*	A				

Nota: 1. NA significa nenhuma amplificação

Exemplo 13. Identificação de Polimorfismos de Promotor de FAD3-1C de Soja

com o promotor de FAD3-1C de soja são usados para identificar a presença de regiões genômicas de soja associadas com certos fenótipos de ácido pouco linolênico. Como notado na Tabela 5, as linhagens pouco linolênicas Soyola e N98-4445 carregaram um alelo diferente em todas as sete posições das outras linhagens tipo silvestre. A presença destes polimorfismos poderia ser usada para identificar a presença de Soyola ou germplasma N98-4445 em cruzamentos para germplasma tipo silvestre.

Tabela 10. Polimorfismos em Região Promotora de FAD3-1C

Posição								
	334	364	385	387	393	729	747	
Soyola	G	C	T	A	C	G	C	
N98-4445	G	C	T	A	C	G	C	
Tipo Silvestre (16linhagens)		A	G	G	T	T	T	T

Todos os métodos e/ou composições descritos e reivindicados aqui podem ser feitos e executados sem experimentação indevida levando em conta a presente descrição. Ao mesmo tempo as composições e métodos desta invenção foram descritos em termos de modalidades preferidas, será evidente para aqueles de experiência na técnica que variações podem ser aplicadas aos métodos e/ou composições e nas etapas ou na sequência de etapas do método descrito aqui sem afastar-se do conceito, espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, será evidente que certos agentes que são tanto quimicamente quanto fisiologicamente relacionados podem ser substituídos pelos agentes descritos aqui ao mesmo tempo em que os mesmos ou resultados similares seriam obtidos. Todos tais substitutos similares e modificações evidentes para aqueles versados na técnica são julgados estarem dentro do espírito, escopo e conceito da invenção como definido pelas reivindicações anexas.

Todas as publicações e pedidos de patente citados neste relatório descritivo estão aqui incorporados por referência como se cada publicação ou pedido de patente individual especificamente e individualmente fosse indicado serem incorporados por referência.

Listagem de Sequência

<110> Fillatti, Joanne
 Voelker, Toni
 Ulmasov, Tim N.
 5 Keithly, Greg E.
 <120> **COMPOSIÇÕES DE ÓLEO E SEMENTE DE SOJA E MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DAS MESMAS**
 <130> 38-77(54449)B
 <150> US 60/781,519
 10 <151> 2006-03-10
 <160> 63
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 420
 15 <212> DNA
 <213> Glycine max
 <220>
 <223> íntron 1 de FAD2-1A
 <400> 1
 20 gtaaaattaaa ttgtgcctgc acctcgggat atttcatgtg gggttcatca tatttgttga 60
 ggaaaagaaa ctcccgaat tgaattatgc atttatatat cctttttcat ttctagattt 120
 cctgaaggct taggtgtagg cacctagcta gtagctacaa tatcagcact tctctctatt 180
 gataaacaat tggctgtaat gccgcagtag aggacgatca caacatttcg tgctgggttac 240
 tttttgtttt atgggtcatga ttctactctc tctaattctc ccattcattt tgtagttgtc 300
 25 attatcttta gatttttcac tacctggttt aaaattgagg gattgtagtt ctgttggttac 360
 atattacaca ttcagcaaaa caactgaaac tcaactgaac ttgtttatac tttgacacag 420
 <210> 2
 <211> 405
 <212> DNA
 30 <213> Glycine max
 <220>
 <223> íntron 1 de FAD2-1B

<400> 2

gtatgatgct	aaattaaatt	gtgcctgcac	cccaggatat	ttcatgtggg	attcatcatt	60
tattgaggaa	aactctccaa	attgaatcgt	gcatttatat	ttttttcca	tttctagatt	120
tcttgaaggc	ttatggtata	ggcacctaca	attatcagca	cttctctcta	ttgataaaca	180
attggctgta	ataccacagt	agagaacgat	cacaacattt	tgtgctgggt	accttttgtt	240
ttatggtcac	gatttcactc	tctctaattc	gtcacttccc	tccattcatt	ttgtacttct	300
catatttttc	acttctctgg	tgaaaattgt	agttctcttg	gtacatacta	gtattagaca	360
ttcagcaaca	acaactgaac	tgaacttctt	tatactttga	cacag		405

<210> 3

10 <211> 1704

<212> DNA

<213> Glycine max

 $\langle 220 \rangle$

<223> promotor de FAD2-1B

15 <400> 3

actatagggc	acgcgtggtc	gacggcccg	gctggtcctc	ggtgtgactc	agccccaagt	60
gacgccaacc	aaacgcgtcc	taactaaggt	gtagaagaaa	cagatagtat	ataagtatac	120
catataagag	gagagtgagt	ggagaagcac	ttctcctttt	ttttctctg	ttgaaattga	180
aagtgttttc	cgggaaataa	ataaaataaa	ttaaaatctt	acacactcta	ggtaggtact	240
tctaatttaa	tccacacttt	gactctatat	atgtttttaa	aataattata	atgcgtactt	300
acttctcat	tatactaaat	ttaacatcga	tgattttatt	ttctgtttct	cttctttcca	360
cctacataca	tccaaaatt	tagggtgcaa	ttttaagttt	attaacacat	gtttttagct	420
gcatgctgcc	tttggtgtg	ctcaccaa	tgcattcttc	tctttatatg	ttgtatttga	480
attttcacac	catatgtaaa	caagattacg	tacgtgtcca	tgatcaaata	caaatgctgt	540
cttatactgg	caatttgata	aacagccgtc	cattttttct	ttttctcttt	aactatatat	600
gctctagaat	ctctgaagat	tcctctgcca	tcgaatttct	ttcttggtaa	caacgctgct	660
gttatgttat	tattttattc	tatttttatt	ttatcatata	tatttcttat	tttgttcgaa	720
gtatgtcata	ttttgatcgt	gacaattaga	ttgtcatgta	ggagtaggaa	tatcacttta	780
aaacattgat	tagtctgtag	gcaatattgt	cttctttttc	ctcctttatt	aatatatttt	840
gtcgaagttt	taccacaagg	ttgattcgct	ttttttgtcc	ctttctcttg	ttctttttac	900
ctcaggtatt	ttagtctttc	atggattata	agatcactga	gaagtgtatg	catgtaatac	960
taagcaccat	agctgttctg	cttgaattta	tttggtgtga	aattgtaatg	tttcagcgtt	1020

	ggctttccct gtagctgcta caatgggtact gtatatctat tttttgcatt gttttcattt	1080
	tttctttttac ttaatcttca ttgctttgaa attaataaaa caatataata tagtttgaac	1140
	tttgaactat tgcctattca tgtaattaac ttattcactg actcttattg tttttctgggt	1200
	agaattcatt ttaaattgaa ggataaatta agaggcaata cttgtaaatt gacctgtcat	1260
5	aattacacag gacctgttt tgtgcctttt tgtctctgtc tttggttttg catgttagcc	1320
	tcacacagat atttagtagt tgttctgcat acaagcctca cacgtatact aaaccagtgg	1380
	acctcaaagt catggcctta cacctattgc atgcgagtct gtgacacaac ccctggtttc	1440
	catattgcaa tgtgctacgc cgtcgtcctt gtttgtttcc atatgtatat tgataccatc	1500
	aaattattat atcattttata tggctctggac cattacgtgt actctttatg acatgtaatt	1560
10	gagtttttta attaaaaaaa tcaatgaaat ttaactacgt agcatcatat agagataatt	1620
	gactagaaat ttgatgactt attcttttct aatcataattt tcttgtattg atagccccgc	1680
	tgtccctttt aaactcccga gaga	1704
	<210> 4	
	<211> 4497	
15	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<220>	
	<223> Clone genômico de FAD2-1A	
	<400> 4	
20	cttgcttggg aacaacgtcg tcaagttatt attttgttct tttttttttt atcatatttc	60
	ttatttttgtt ccaagtatgt catattttga tccatcttga caagtagatt gtcatgtagg	120
	aataggaata tcactttaaa ttttaaagca ttgattagtc tgtaggcaat attgtcttct	180
	tcttctcctt tattaatatt ttttattctg ccttcaatca ccagttatgg gagatggatg	240
	taataactaaa taccatagtt gttctgcttg aagtttagtt gtatagttgt tctgcttgaa	300
25	gtttagttgt gtgtaatggt tcagcgttgg ctccccctgt aactgctaca atgggtactga	360
	atatatatatt tttgcattgt tcattttttt cttttactta atcttcattg ctttgaaatt	420
	aataaaacaa aaagaaggac cgaatagttt gaagtttgaa ctattgccta ttcattgtaac	480
	ttattcaccc aatcttatat agtttttctg gtagagatca ttttaaattg aaggatataa	540
	attaagagga aatacttgta tgtgatgtgt ggcaatttgg aagatcatgc gtagagagtt	600
30	taatggcagg ttttgcaaat tgacctgtag tcataattac actgggccct ctcgaggttt	660
	tgtgcctttt tgttgtcgct gtgtttgggt ctgcatgtta gcctcacaca gatatttagt	720
	agttgttggt ctgcatataa gcctcacacg taaactaaac gaggtaacct caaatcatg	780

	gccttacacc tattgagtga aattaatgaa cagtgcacgt gagtatgtga ctgtgacaca	840
	acccccggtt ttcattatgc aatgtgctac tgtgggtgatt aaccttgcta cactgtcgtc	900
	cttgtttggt tccttatgta tattgatacc ataaattatt actagtatat cattttatat	960
	tgtccatacc attacgtggt tatagtctct ttatgacatg taattgaatt ttttaattat	1020
5	aaaaaataat aaaacttaac tacgtactat aaagagatgc tcttgactag aattgtgatc	1080
	tcctagtttc ctaaccatat actaatatct gcttgatttg atagccccct cggtcccaag	1140
	agtataaaac tgcacgaat aatacaagcc actaggcatg gtaaattaaa ttgtgcctgc	1200
	acctcgggat atttcatgtg gggttcatca tatttggtga ggaaaagaaa ctcccgaat	1260
	tgaattatgc atttatatat cctttttcat ttctagattt cctgaaggct taggtgtagg	1320
10	cacctagcta gtagctacaa tatcagcact tctctctatt gataaacaat tggctgtaac	1380
	gccgcagtag aggacgatca caacatttcg tgcgtggttac tttttgtttt atggctcatga	1440
	tttcaactctc tctaactctc ccattcattt tgtagttgtc attatcttta gatttttcac	1500
	tacctgggtt aaaattgagg gattgtagtt ctggttggtac atattacaca ttcagcaaaa	1560
	caactgaaac tcaactgaac ttgtttatac ttgacacag ggtctagcaa aggaaacaac	1620
15	aatgggaggt agaggctcgtg tggcaaagtg gaagttcaag ggaagaagcc tctctcaagg	1680
	gttccaaaca caaagccacc attcaactgtt ggccaactca agaaagcaat tccaccacac	1740
	tgttttcagc gtcctctcct cacttcattc tctatgttg tttatgacct ttcatttgcc	1800
	ttcattttct acattgccac cacctacttc cacctccttc ctcaaccctt ttccctcatt	1860
	gcatggccaa tctattgggt tctccaaggt tgccttctca ctggtgtgtg ggtgattgct	1920
20	cacgagtgtg gtcacatgc cttcagcaag taccaatggg ttgatgatgt tgtgggtttg	1980
	accttcact caacactttt agtccttat ttctcatgga aaataagcca tcgccccat	2040
	cactccaaca caggttccct tgaccgtgat gaagtgttg tcccaaaacc aaaatccaaa	2100
	gttgcatggt tttccaagta cttaaacaac cctctaggaa gggctgttct tcttctcgtc	2160
	acactcacia taggggtggc tatgtattta gccttcaatg tctctggtag acctatgat	2220
25	agttttgcaa gccactacca cccttatgct cccatatatt ctaaccgtga gaggttctg	2280
	atctatgtct ctgatgttg tttgttttct gtgacttact ctctctaccg tgttgcaacc	2340
	ctgaaagggt tgggttggt gctatgtgtt tatggggtgc ctttgctcat tgtgaacggt	2400
	tttcttgtga ctatcacata ttgacagcac acacactttg cttgcctca ttacgattca	2460
	tcagaatggg actggctgaa gggagctttg gcaactatgg acagagatta tgggattctg	2520
30	aacaagggtgt ttcacacat aactgatact catgtggctc accatctctt ctctacaatg	2580
	ccacattacc atgcaatgga ggcaaccaat gcaatcaagc caatattggg tgagtactac	2640
	caatttgatg acacaccatt ttacaaggca ctgtggagag aagcgagaga gtgcctctat	2700

	gtggagccag atgaaggaac atccgagaag ggcgtgtatt ggtacaggaa caagtattga	2760
	tggagcaacc aatgggcat agtgggagtt atggaagttt tgcatgtat tagtacataa	2820
	ttagtagaat gttataaata agtggatttg ccgcgtaatg actttgtgtg tatttgtaaa	2880
	cagcttggtg cgatcatggt tataatgtaa aaataattct ggtattaatt acatgtggaa	2940
5	agtgttctgc ttatagcttt ctgcctaaaa tgcacgctgc acgggacaat atcattggta	3000
	atTTTTTTaa aatctgaatt gaggtactc ataatactat ccataggaca tcaaagacat	3060
	gttgcatgga ctttaagcag aggttcatct agaggattac tgcattaggct tgaactacaa	3120
	gtaatttaag ggacgagagc aacttttagct ctaccacgtc gttttacaag gttattaaaa	3180
	tcaaattgat cttattaaaa ctgaaaattt gtaataaaat gctattgaaa aattaaaata	3240
10	tagcaaacac ctaaattgga ctgattttta gattcaaatt taataattaa tctaaattaa	3300
	acttaaattt tataatatat gtcttgtaat atatcaagtt ttttttttta ttattgagtt	3360
	tggaaacata taataaggaa cattagttaa tattgataat ccactaagat cgacttagta	3420
	ttacagtatt tggatgattt gtatgagata ttcaaacttc actcttatca taatagagac	3480
	aaaagttaat actgatgggtg gagaaaaaaa aatgttattg ggagcatatg gtaagataag	3540
15	acggataaaa atatgctgca gctgggagag ctaatgtatt ttttggtgaa gttttcaagt	3600
	gacaactatt catgatgaga acacaataat attttctact tacctatccc acataaaata	3660
	ctgattttta taatgatgat aaataatgat taaaatattt gattctttgt taagagaaat	3720
	aaggaaaaaca taaatattct catggaaaaa tcagcttgta ggagtagaaa ctttctgatt	3780
	ataattttta tcaagtttaa ttcattcttt taattttatt attagtacaa aatcattctc	3840
20	ttgaatttag agatgtatgt ttagcttaa tagtaatttt ttatttttat aataaaattc	3900
	aagcagtcaa atttcatcca aataatcgtg ttcgtgggtg taagtcagtt attccttctt	3960
	atcttaatat acacgcaaag gaaaaataa aaataaaatt cgaggaagcg cagcagcagc	4020
	tgataccacg ttggttgacg aaactgataa aaagcgtgt cattgtgtct ttgtttgatc	4080
	atcttcacaa tcacatctcc agaacacaaa gaagagtgtc cttcttctct gttattccac	4140
25	ttgcgttagg tttctacttt cttctctctc tctctctctc tcttcattcc tcatttttcc	4200
	ctcaaacaat caatcaattt tcattcagat tcgtaaattt ctcgattaga tcacgggggtt	4260
	aggtctccca ctttatcttt tccaagcct ttctctttcc ccttttccct gtctgcccc	4320
	taaaattcag gatcggaac gaactgggtt cttgaatttc actctagatt ttgacaaatt	4380
	cgaagtgtgc atgcactgat gcgaccact cccctttttt tgcattaaac aattatgaat	4440
30	tgaggttttt cttgcgatca tcattgcttg aattgaatca tattaggttt agattct	4497

<210> 5

<211> 206

<212> DNA
 <213> Glycine max
 <220>
 <223> 3'UTR de FAD2-1A
 5 <400> 5
 tggagcaacc aatgggcat agtgggagtt atggaagttt tgtcatgtat tagtacataa 60
 ttagtagaat gttataaata agtggatttg ccgcgtaatg actttgtgtg tattgtgaaa 120
 cagcttggtg cgatcatggt tataatgtaa aaataattct ggtattaatt acatgtggaa 180
 agtgttctgc ttatagcttt ctgcct 206
 10 <210> 6
 <211> 125
 <212> DNA
 <213> Glycine max
 <220>
 15 <223> 5'UTR de FAD2-1A
 <400> 6
 ccatatacta atatttgctt gtattgatag ccctccgtt cccaagagta taaaactgca 60
 tcgaataata caagccacta ggcattgggtc tagcaaagga aacaacaatg ggaggtagag 120
 gtcgt 125
 20 <210> 7
 <211> 191
 <212> DNA
 <213> Glycine max
 <220>
 25 <223> intron 1 de FAD3-1A
 <400> 7
 gtaataattt ttgtgttct tactcttttt tttttttttt tgtttatgat atgaatctca 60
 cacattgttc tgttatgtca tttcttcttc atttggtttt agacaactta aatttgagat 120
 ctttattatg tttttgctta tatggtaaag tgattcttca ttatttcatt cttcattgat 180
 30 tgaattgaac a 191
 <210> 8
 <211> 346

<212> DNA
 <213> Glycine max
 <220>
 <223> íntron 2 de FAD3-1A
 5 <400> 8
 ttagttcata ctggcttttt tgtttgttca tttgtcattg aaaaaaatc ttttgttgat 60
 tcaattatatt ttatagtgtg tttggaagcc cgtttgagaa aataagaaat cgcacatctgga 120
 atgtgaaagt tataactatt tagcttcacg tgcgttgca agttctttta ttgggttaa 180
 ttttatagcg tgctaggaaa cccattcgag aaaataagaa atcacatctg gaatgtgaaa 240
 10 gttataactg ttagcttctg agtaaactg gaaaaaccac attttggatt tggaaccaa 300
 ttttatttga taaatgacaa ccaaattgat tttgatggat tttgca 346
 <210> 9
 <211> 142
 <212> DNA
 15 <213> Glycine max
 <220>
 <223> íntron 3A de FAD3-1A
 <400> 9
 gtatgtgatt aattgcttct cctatagttg ttcttgattc aattacattt tatttatttg 60
 20 gtaggtccaa gaaaaaaggg aatctttatg cttcttgagg ctgttcttga acatggctct 120
 tttttatgtg tcattatctt ag 142
 <210> 10
 <211> 1228
 <212> DNA
 25 <213> Glycine max
 <220>
 <223> íntron 4 de FAD3-1A
 <400> 10
 taacaaaaat aaatagaaaa tagtgggtga acacttaaat gcgagatagt aatacctaaa 60
 30 aaaagaaaaa aatataggta taataaataa tataactttc aaaataaaaa gaaatcatag 120
 agtctagcgt agtgtttggg gtgaaatgat gttcacctac cattactcaa agattttgtt 180
 gtgtccctta gttcattctt attattttac atatcttact tgaaaagact ttttaattat 240

	tcattgagat cttaaagtga ctgttaaatt aaaataaaaa acaagtttgt taaaacttca	300
	aataaataag agtgaaggga gtgtcatttg tcttctttct tttattgcgt tattaatcac	360
	gtttctcttc tctttttttt ttttcttctc tgctttccac ccattatcaa gttcatgtga	420
	agcagtggcg gatctatgta aatgagtggg gggcaattgc accacaaga ttttattttt	480
5	tatttgtaca ggaataataa aataaaactt tgccccata aaaaataaat attttttctt	540
	aaaataatgc aaaataaata taagaaataa aaagagaata aattattatt aattttatta	600
	ttttgtactt tttatttagt ttttttagcg gttagatttt tttttcatga cattatgtaa	660
	tcttttaaaa gcatgtaata tttttatttt gtgaaaataa atataaatga tcatattagt	720
	ctcagaatgt ataaactaat aataatttta tcaactaaaag aaattctaatt ttagtccata	780
10	aataagtaaa acaagtgaca attataatttt atatttactt aatgtgaaat aatacttgaa	840
	cattataata aaacttaatg acaggagata ttacatagtg ccataaagat attttaaaaa	900
	ataaaatcat taatacactg tactactata taatattcga tatatatattt taacatgatt	960
	ctcaatagaa aaattgtatt gattatattt tattagacat gaatttaca gccccgtttt	1020
	tcatttatag ctcttacctg tgatctattg ttttgcttcg ctgtttttgt tgggtcaagg	1080
15	acttagatgt cacaatatta atactagaag taaatattta tgaaaacatg taccttacct	1140
	caacaaagaa agtgtggtaa gtggcaacac acgtgttgca tttttggccc agcaataaca	1200
	cgtgtttttg tgggtgtacta aaatggac	1228
	<210> 11	
	<211> 625	
20	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<220>	
	<223> íntron 5 de FAD3-1A	
	<400> 11	
25	gtacatttta ttgcttattc acctaaaaac aatacaatta gtacatttgt tttatctctt	60
	ggaagttagt cattttcagt tgcattgattc taatgctctc tccattctta aatcatgttt	120
	tcacacccac ttcattttaa ataagaacgt ggggtgttatt ttaatttcta ttcactaaca	180
	tgagaaatta acttatttca agtaataatt ttaaaatatt tttatgctat tattttatta	240
	caaataatta tgtatattaa gtttattgat tttataataa ttatattaaa attatatoga	300
30	tattaatttt tgattcactg atagtgtttt atattgtag tactgtgcat ttattttaaa	360
	attggcataa ataatatatg taaccagctc actatactat actgggagct tgggtgtgaa	420
	aggggttccc aaccctcctt tctaggtgta catgctttga tacttctggt accttcttat	480

	atcaatataa attatatttt gctgataaaa aaacatgggt aaccattaaa ttcttttttt	540
	aaaaaaaaa ctgtatctaa actttgtatt attaaaaaga agtctgagat taacaataaa	600
	ctaacactca ttgggattca ctgca	625
	<210> 12	
5	<211> 98	
	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<220>	
	<223> íntron 3B de FAD3-1A	
10	<400> 12	
	ggtgagtgat tttttgactt ggaagacaac aacacattat tattataata tggttcaaaa	60
	caatgacttt ttctttatga tgtgaactcc atttttta	98
	<210> 13	
	<211> 115	
15	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<220>	
	<223> íntron 3C de FAD3-1A	
	<400> 13	
20	ggtaactaaa ttactcctac attgttactt tttctcctt tttttatta tttcaattct	60
	ccaattggaa atttgaaata gttaccataa ttatgtaatt gtttgatcat gtgca	115
	<210> 14	
	<211> 1037	
	<212> DNA	
25	<213> Glycine max	
	<220>	
	<223> íntron 4 de Fad3-1C	
	<400> 14	
	gtaacaaaaa taaatagaaa atagtgagtg aacacttaaa tgtagatatac taccttcttc	60
30	ttcttttttt tttttttttt gaggttaatg ctagataata gctagaaaga gaaagaaaga	120
	caaatatagg taaaaataaa taatataacc tgggaagaag aaaacataaa aaaagaaata	180
	atagagtcta cgtaatgttt ggatttttga gtgaaatgggt gttcacctac cattactcaa	240

	agattctgtt gtctacgtag tgtttggact ttggagtga atggtgttca cctaccatta	300
	ctcagattct gttgtgtccc ttagttactg tcttatattc ttagggata ttctttattt	360
	tacatccttt tcacatctta cttgaaaaga ttttaattat tcattgaaat attaacgtga	420
	cagttaaatt aaaataataa aaaattcggt aaaacttcaa ataaataaga gtgaaaggat	480
5	catcattttt cttctttctt ttattgctgt attaatcatg cttctcttct ttttttctt	540
	cgctttccac ccatatcaaa ttcattgtga gtatgagaaa atcacgattc aatggaaagc	600
	tacaggaacy ttttttggtt tgtttttata atcggaatta atttatactc cattttttca	660
	caataaatgt tacttagtgc cttaaagata atatttgaaa aattaataaa attattaata	720
	cactgtacta ctatataata ttgacatat atttaacatg attttctatt gaaaatttgt	780
10	atttattatt ttttaataca aaccataag gcattaattt acaagacca tttttcattt	840
	atagctttac ctgtgatcat ttatagcttt aagggtacta gatgttaca tcttaattac	900
	aagtaaatat ttatgaaaaa catgtgtctt accccttaac cttacctca caaagaaagt	960
	gtgataagtg gcaacacacg tgttgctttt ttggcccagc aataacacgt gtttttgtgg	1020
	tgtacaaaaa tggacag	1037
15	<210> 15	
	<211> 4010	
	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<220>	
20	<223> clone genômico parcial de FAD3-1A	
	<400> 15	
	acaaagcctt tagcctatgc tgccaataat ggataccaac aaaagggttc ttcttttgat	60
	tttgatccta gcgctcctcc accgtttaag attgcagaaa tcagagcttc aatacaaaaa	120
	cattgctggg tcaagaatcc atggagatcc ctcagttatg ttctcaggga tgtgcttgta	180
25	attgctgcat tgggtggctgc agcaattcac ttcgacaact ggcttctctg gctaattctat	240
	tgccccattc aaggcacaat gttctgggct ctctttgttc ttggacatga ttggtaataa	300
	tttttgtgtt tcttactctt tttttttttt ttttgtttat gatatgaatc tcacacattg	360
	ttctgttatg tcatttcttc ttcatttggc tttagacaac ttaaatttga gatctttatt	420
	atgtttttgc ttatatggta aagtgattct tcattatttc attcttcatt gattgaattg	480
30	aacagtggcc atggaagctt ttcatagatgc cctttgctga atagcctggt gggacacatc	540
	ttgcattcct caattcttgt gccataccat ggatgggttag ttcatactgg cttttttgtt	600
	tgttcatttg tcattgaaaa aaaatctttt gttgattcaa ttatttttat agtgtgtttg	660

	gaagcccgtt	tgagaaaata	agaaatcgca	tctggaatgt	gaaagttata	actatttagc	720
	ttcatctgtc	gttgcaagtt	cttttatttg	ttaaattttt	atagcgtgct	aggaaaccca	780
	ttcgagaaaa	taagaaatca	catctggaat	gtgaaagtta	taactgttag	cttctgagta	840
	aacgtggaaa	aaccacattt	tggatttgga	accaaatttt	atttgataaa	tgacaaccaa	900
5	attgattttg	atggattttg	caggagaatt	agccacagaa	ctcaccatga	aaaccatgga	960
	cacattgaga	aggatgagtc	atgggttcca	gtatgtgatt	aattgcttct	cctatagtgt	1020
	ttcttgattc	aattacattt	tatttatttg	gtaggtccaa	gaaaaaagg	aatctttatg	1080
	cttctgagg	ctgttcttga	acatggctct	tttttatgtg	tcattatctt	agttaacaga	1140
	gaagatttac	aagaatctag	acagcatgac	aagactcatt	agattcactg	tgccatttcc	1200
10	atgtttgtgt	atccaattta	tttggtagt	gattttttga	cttgaagac	aacaacacat	1260
	tattattata	atatggttca	aaacaatgac	tttttcttta	tgatgtgaac	tccatttttt	1320
	agttttcaag	aagccccgga	aaggaaggct	ctcacttcaa	tccttacagc	aatctgtttc	1380
	caccagtgga	gagaaaagga	atagcaatat	caacactgtg	ttgggctacc	atgttttctc	1440
	tgcttatcta	tctctcattc	attaactagt	ccacttctag	tgctcaagct	ctatggaatt	1500
15	ccatattggg	taactaaatt	actcctacat	tgttactttt	tctcctttt	ttttattatt	1560
	tcaattctcc	aattggaaat	ttgaaatagt	taccataatt	atgtaattgt	ttgatcatgt	1620
	gcagatgttt	gttatgtggc	tggactttgt	cacatacttg	catcaccatg	gtcaccacca	1680
	gaaactgcct	tggtaccgcg	gcaaggtaac	aaaaataaat	agaaaatagt	gggtgaacac	1740
	ttaaatgcga	gatagtaata	cctaaaaaaa	gaaaaaaata	taggtataat	aaataatata	1800
20	actttcaaaa	taaaaagaaa	tcatagagtc	tagcgtagtg	tttggagtga	aatgatgttc	1860
	acctaccatt	actcaaagat	tttgttgtgt	cccttagttc	attcttatta	ttttacatat	1920
	cttacttgaa	aagacttttt	aattattcat	tgagatctta	aagtgactgt	taaattaaaa	1980
	taaaaaacia	gtttgttaaa	acttcaaata	aataagagtg	aagggagtgt	catttgtctt	2040
	ctttctttta	ttgcgttatt	aatcacgttt	ctcttctctt	tttttttttt	cttctctgct	2100
25	ttccacccat	tatcaagtgc	atgtgaagca	gtggcggatc	tatgtaaatg	agtggggggc	2160
	aattgcaccc	acaagatttt	attttttatt	tgtacaggaa	taataaaata	aaactttgcc	2220
	cccataaaaa	ataaatattt	tttcttaaaa	taatgcaaaa	taaatataag	aaataaaaag	2280
	agaataaatt	attattaatt	ttattatttt	gtacttttta	tttagttttt	ttagcgggta	2340
	gatttttttt	tcatgacatt	atgtaatctt	ttaaaagcat	gtaatatatt	tattttgtga	2400
30	aaataaatat	aatgatcat	attagtctca	gaatgtataa	actaataata	attttatcac	2460
	taaaagaaat	tctaatttag	tccataaata	agtaaaacia	gtgacaatta	tattttatat	2520
	ttacttaatg	tgaaataata	cttgaacatt	ataataaaac	ttaatgacag	gagatattac	2580

	atagtgccat aaagatatatt taaaaaataa aatcattaat aactgtact actatataat	2640
	attcgatata tattttttaac atgattctca atagaaaaat tgtattgatt atattttatt	2700
	agacatgaat ttacaagccc cgtttttcat ttatagctct tacctgtgat ctattgtttt	2760
	gcttcgctgt ttttggtggt caagggactt agatgtcaca atattaatac tagaagtaaa	2820
5	tatttatgaa aacatgtacc ttacctcaac aaagaaagtg tggttaagtgg caacacacgt	2880
	gttgcatttt tggcccagca ataacacgtg tttttgtggt gtactaaaat ggacaggaat	2940
	ggagttatatt aagaggtggc ctcaccactg tggatcgtga ctatgggttg atcaataaca	3000
	ttcaccatga cattggcacc catgttatcc accatctttt cccccaatt cctcattatc	3060
	acctcgttga agcgggtacat tttattgctt attcacctaa aaacaataca attagtacat	3120
10	ttgttttatc tcttggaagt tagtcatttt cagttgcatg attctaagtc tctctocatt	3180
	cttaaactcat gttttcacac ccacttcatt taaaaataaga acgtgggtgt tatttttaatt	3240
	tctattcact aacatgagaa attaacttat ttcaagtaat aatttttaaa tatttttatg	3300
	ctattatttt attacaaata attatgtata ttaagtttat tgattttata ataattatat	3360
	taaaattata tcgatattaa tttttgattc actgatagtg ttttatattg ttagtactgt	3420
15	gcattttatt taaaattggc ataaataata tatgtaacca gctcactata ctatactggg	3480
	agcttggtgg tgaaaggggt tcccaaccct cctttctagg tgtacatgct ttgatacttc	3540
	tggtaccttc ttatatcaat ataaattata ttttgctgat aaaaaaacat ggtaaccat	3600
	taaattcttt ttttaaaaaa aaaactgtat ctaaactttg tattattaaa aagaagtctg	3660
	agattaacaa taaactaaca ctcatttgga ttactgcag acacaagcag caaaaccagt	3720
20	tcttgagat tactaccgtg agccagaaag atctgcgcca ttaccatttc atctaataaa	3780
	gtatttaatt cagagtatga gacaagacca cttcgtaagt gacactggag atgttgttta	3840
	ttatcagact gattctctgc tctccactc gcaacgagac tgagtttcaa actttttggg	3900
	ttattattta ttgattctag ctactcaaat tacttttttt ttaatgttat gttttttgga	3960
	gtttaacggt ttctgaacaa cttgcaaatt acttgcatag agagacatgg	4010
25	<210> 16	
	<211> 184	
	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<220>	
30	<223> 3'UTR de FAD3-1A	
	<400> 16	
	gtttcaaact ttttgggtta ttatttattg gattctagct actcaaatta cttttttttt	60

	aatgttatgt tttttggagt ttaacgtttt ctgaacaact tgcaaattac ttgcatagag	120
	agacatggaa tattttatttg aaattagtaa ggtagtaata ataaattttg aattgtcagt	180
	ttca	184
	<210> 17	
5	<211> 143	
	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<220>	
	<223> 5'UTR de FAD3-1A	
10	<400> 17	
	tgcggttata taaatgcact atcccataag agtatttttc gaagatttcc ttcttctat	60
	tctaggtttt tacgcaccac gtatccctga gaaaagagag gaaccacact ctctaagcca	120
	aagcaaaagc agcagcagca gca	143
	<210> 18	
15	<211> 2683	
	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<220>	
	<223> clone genômico parcial de FAD3-1B	
20	<400> 18	
	gttcaagcac agcctctaca acatgttggt aatgggtgcag ggaaagaaga tcaagcttat	60
	tttgatccaa gtgctccacc acccttcaag attgcaaata tcagagcagc aattccaaaa	120
	cattgctggg agaagaacac attgagatct ctgagttatg ttctgaggga tgtgttggtg	180
	gtgactgcat tggtagctgc agcaatcggc ttcaatagct ggttcttctg gccactctat	240
25	tggcctgcac aaggcacaat gttttgggca ctttttggtc ttggacatga ttggttaacta	300
	attattatta caaattgtta tgttatgtta tgttatgttg ttgtgccttt ttctcagtga	360
	tgcttttagtc atttcatttc acttggttat gcatgattgt tcgttcatat gttctgtcat	420
	ggtgagttct aatttgattg atgcatggaa cagtgggtcat ggaagttttt caaacagtcc	480
	tttggtgaac agcattgtgg gccacatctt gcactcttca attcttgtac cataccatgg	540
30	atggtcggtt ccttttagca acttttcatg ttcactttgt ccttaaattt ttttttatgt	600
	ttgttaaaaa atctttggtc tgatttaaca acctaaccat ttttacaact catggatttt	660
	ttgcaggaga attagccaca ggactcacca tcagaaccat ggccatgttg agaaggatga	720

	atcatggggtt ccggtattac tatgagtttg cttgattaat ttccacattt tttctttctt	780
	cttaatttta atcagtgggtt agatttggtt gtgttccgat agaagaaaag ggggtatcta	840
	gagagatgtg aatttcatga agtgggttcat gattatgtgt ctttatgcct ttatgtcagc	900
	ttacagagaa agtttacaag aatctagaca acatgacaag aatgatgaga ttcactcttc	960
5	ctttcccat ctttgcatac cccttttatt tgggtgagacc ctctttttcc agaatgacag	1020
	cattatttta ctatatagta cctcaatttt tatatttcta aaattttgaa ttcttgaaat	1080
	tgaaaggaaa ggactttatt ggggtctagca tctcactctc tctttgtgat atgaaccata	1140
	tatttcagtg gagcagaagc cctggaaaag aaggctctca tttcaaccct tacagcaact	1200
	tgttctctcc tgggtgagaga agagatgtgc taacttcaac tctatgttgg ggcatcatgc	1260
10	tttctgtgct tctctatctt tccctcacia tgggtccact ttttatgctc aagctctatg	1320
	gggttcccta tttggtaac tcaactctac actttcttta tacatcgac gccagtgtgg	1380
	gttatttgca acctacaccg aagtaatgcc ctataattaa tgaggtaac acatgtccaa	1440
	gtccaatatt ttgttcaact atttgaactt gaacatgtgt agatcttcgt catgtggctg	1500
	gatttcgtca cgtacttgca tcatcatggt tacaagcaga aactgccttg gtaccgtggc	1560
15	caggtatccc atttaacaca atttgtttca ttaacatttt aagagaattt ttttttcaa	1620
	atagttttcg aaattaagca aataccaagc aaattgttag atctacgctt gtacttgttt	1680
	taaagtcaaa ttcattgacca aattgtcctc acaagtcaa accgtccact attttatttt	1740
	cactacttt atagccaat ttgccatttg gttacttcag aaaagagaac cccatttgta	1800
	gtaaatatat tatttatgaa ttatggtagt ttcaacataa aacatactta tgtgcagttt	1860
20	tgccatcctt caaaagaagg tagaaactta ctccatgtta ctctgtctat atgtaatttc	1920
	acaggaatgg agttatctaa ggggtggtct tacaacagta gatcgcgact atggttggat	1980
	caacaacatt caccatgaca ttggcaccca tgttatccat caccttttcc ctcaaattcc	2040
	acattatcat ttaatcgaag cggattaat tctctatttc acaagaaatt attgtatgtc	2100
	tgcttatgtg atctaagtca attttcacat aacacatgat caaactttct taattctttc	2160
25	ttctaaattg aaaaagtgga ttatatgtca attgaaaatt ggtcaagacc acaaacatgt	2220
	gatgatctcc caccttacat ataataattt ctctattct acaatcaata atccttctat	2280
	ggctctgaat tgttcccttc ttttttcatt ttcttattct ttttgtgtc ccacaataga	2340
	ctaaagcagc aaaggcagtg ctaggaaagt attatcgtga gcctcagaaa tctgggccat	2400
	tgccacttca tctaataaag tacttgctcc acagcataag tcaggatcac ttcgttagcg	2460
30	actctggcga catttgtgtac taccagactg attcccagct ccacaaagat tcttggaccc	2520
	agtccaacta aagtttttga tgctacattt acctatttca ctcttaaata ctatttcccta	2580
	tgtaatatgt aatttagaat atgttaccta ctcaaatcaa ttaggtgaca tgtataagct	2640

ttcataaaatt atgctagaaa tgcacttact tttcaaagca tgc 2683

<210> 19

<211> 160

<212> DNA

5 <213> Glycine max

<220>

<223> intron 1 de FAD3-1B

<400> 19

gtaactaatt attattacaa attgttatgt tatgttatgt tatgttggtg tgcctttttc 60

10 tcagtgatgc tttagtcatt tcatttcact tggttatgca tgattgttcg ttcataatgtt 120

ctgtcatggg gagttctaatt ttgattgatg catggaacag 160

<210> 20

<211> 119

<212> DNA

15 <213> Glycine max

<220>

<223> intron 2 de FAD3-1B

<400> 20

gttcctttta gcaacttttc atgttcactt tgcctttaa ttttttttta tgtttgttaa 60

20 aaaatccttg gtctgattta acaacctaac catttttaca actcatggat tttttgcag 119

<210> 21

<211> 166

<212> DNA

<213> Glycine max

25 <220>

<223> intron 3a de FAD3-1B

<400> 21

gtattactat gagtttgctt gattaatttc cacatttttt ctttcttctt aattttaatc 60

agtgggttaga tttggttggt ttccgataga agaaaagggg gtatctagag agatgtgaat 120

30 ttcatagaagt ggttcacatg tatgtgtctt tatgccttta tgtcag 166

<210> 22

<211> 156

<212> DNA
 <213> Glycine max
 <220>
 <223> íntron 3b de FAD3-1B
 5 <400> 22
 gtgagaccct ctttttccag aatgacagca ttattttact atatagtacc tcaattttta 60
 tattttctaaa attttgaatt cttgaaattg aaaggaaagg actttattgg gtctagcatc 120
 tcactctctc tttgtgatat gaaccatata tttcag 156
 <210> 23
 10 <211> 148
 <212> DNA
 <213> Glycine max
 <220>
 <223> íntron 3c de FAD3-1B
 15 <400> 23
 gtaatctcac tctcacactt tctttataca tcgcacgcca gtgtgggtta tttgcaacct 60
 acaccgaagt aatgccctat aattaatgag gttaacacat gtccaagtcc aatattttgt 120
 tcacttattt gaacttgaac atgtgtag 148
 <210> 24
 20 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Glycine max
 <220>
 <223> íntron 4 de FAD3-1B
 25 <400> 24
 taacacaatt tgtttcatta acattttaag agaatttttt tttcaaaata gttttcgaaa 60
 ttaagcaaat accaagcaaa ttgtagatc tacgcttgta cttgttttaa agtcaaattc 120
 atgaccaaatt tgcctcaca agtccaaacc gtccactatt ttattttcac ctactttata 180
 gcccaatttg ccatttggtt acttcagaaa agagaacccc attttagta aatatattat 240
 30 ttatgaatta tggtagtttc aacataaaac atacttatgt gcagttttgc catccttcaa 300
 aagaaggtag aaacttactc catgttactc tgtctatatg taatttcaca g 351
 <210> 25

<211> 277
 <212> DNA
 <213> Glycine max
 <220>
 5 <223> íntron 5 de FAD3-1B
 <400> 25
 gtattaattc tctatttcac aagaaattat tgtatgtctg cctatgtgat ctaagtcaat 60
 tttcacataa cacatgatca aactttctta attctttctt ctaaattgaa aaagtggatt 120
 atatgtcaat tgaaaattgg tcaagaccac aaacatgtga tgatctccca ccttacatat 180
 10 aataatttct cctattctac aatcaataat ccttctatgg tctgaattg ttcctttctt 240
 ttttcatttt cttattcttt ttgttgctcc acaatag 277
 <210> 26
 <211> 158
 <212> DNA
 15 <213> Glycine max
 <220>
 <223> 3'UTR de FAD3-1B
 <400> 26
 agtttttgat gctacattta cctatttcac tcttaaatac tatttcctat gtaatatgta 60
 20 atttagaata tgttacctac tcaaatcaat taggtgacat gtataagctt tcataaatta 120
 tgctagaaat gcacttactt ttcaaagcat gctatgtc 158
 <210> 27
 <211> 83
 <212> DNA
 25 <213> Glycine max
 <220>
 <223> 5'UTR de FAD3-1B
 <400> 27
 tctaatacga ctactatag ggcaagcagt ggtatcaacg cagagtacgc gggggtaaca 60
 30 gagaaagaaa catttgagca aaa 83
 <210> 28
 <211> 4083

<212> DNA

<213> Glycine max

<220>

<223> clone genômico de FATB-1

5 <400> 28

	gggaaacaac aaggacgcaa aatgacacaa tagcccttct tccctgtttc cagcttttct	60
	ccttctctct ctcacatcttc ttcttcttct tcaactcagtc aggtacgcaa acaaatctgc	120
	tattcattca ttcatctctc ttctctctctg atcgcaaact gcacctctac gctccactct	180
	tctcattttc tottcttttc tcgcttctca gatccaactc ctcagataac acaagaccaa	240
10	accgcctttt tctgcatttc tagactagac gttctaccgg agaaggttct cgattctttt	300
	ctcttttaac ttatttttta aaataataat aatgagagct ggatgcgtct gttcgttgtg	360
	aatttcgagg caatgggggt ctcattttcg ttacagttac agattgcatt gtctgctttc	420
	ctcttctccc ttgtttcttt gccttgtctg atttttcggt ttattttctt acttttaatt	480
	tttggggatg gatatttttt ctgcattttt tcgggttgcg atgttttcag gattccgatt	540
15	ccgagtcaga tctgcgccgg cttatacgac gaatttggtc ttattcgcaa cttttcgctt	600
	gattggcttg ttttacctct ggaatctcac acgtgatcaa ataagcctgc tattttagtt	660
	gaagtagaat ttgttcttta tcggaaagaa ttctatggat ctgttctgaa attggagcta	720
	ctgtttcgag ttgctatttt ttttagtagt attaagaaca agtttgcctt ttattttaca	780
	tttttttctt ttgcttttgc caaaagtttt tatgatcact ctcttctgtt tgtgatataa	840
20	ctgatgtgct gtgctgttat tatttgttat ttggggtgaa gtataatttt ttgggtgaac	900
	ttggagcatt tttagtcgga ttgatttctc gatatcattt aaggctaagg ttgacctcta	960
	ccacgcgttt gcgtttgatg ttttttccat ttttttttta tctcatatct ttacagtgt	1020
	ttgcctatth gcatttctct totttatccc ctttctgtgg aaagggtgga gggaaaatgt	1080
	atthtttttt tctcttctaa cttgcgtata ttttgcattc agcgacctta gaaattcatt	1140
25	atggtggcaa cagctgctac ttcatcattt tccctgtta cttcacctc gccggactct	1200
	ggtggagcag gcagcaaact tgggtggtggg cctgcaaacc ttggaggact aaaatccaaa	1260
	tctgcgtctt ctggtggctt gaaggcaaag gcgcaagccc cttcgaaaat taatggaacc	1320
	acagttgtta catctaaaga aggttcaag catgatgatg atctacctc gcctcccccc	1380
	agaactttta tcaaccagtt gcctgattgg agcatgcttc ttgctgctat cacaacaatt	1440
30	ttcttggccg ctgaaaagca gtggatgatg cttgattgga agccacggcg acctgacatg	1500
	cttattgacc ctttgggat aggaaaaatt gttcaggatg gtcttgtgtt ccgtgaaaac	1560
	ttttctatta gatcatatga gattggtgct gatcgtagcg catctataga aacagtaatg	1620

	aaccatttgc aagtaagtcc gtcctcatatc aagtgaatct ttatgatctt cagagatgag	1680
	tatgctttga ctaagatagg gctgtttatt tagacactgt aattcaattt catatataga	1740
	taatatcatt ctgttggttac ttttcatact atattttatat caactatttg cttacaaca	1800
	ggaaactgca cttaatcatg ttaaaagtgc tgggcttctt ggtgatggct ttggttcac	1860
5	gccagaaatg tgcaaaaaga acttgatatg ggtggttact cggatgcagg ttgtggtgga	1920
	acgctatcct acatgggttag tcatctagat tcaaccatta catgtgattt gcaatgtatc	1980
	catgttaagc tgctatttct ctgtctatct tagtaatctt tatgaggaat gatcactcct	2040
	aaatatattc atggtaatta ttgagactta attatgagaa caaaatgct ttggaaattt	2100
	gtctgggatg aaaattgatt agatacaca gctttataca tgatgaacta tgggaaacct	2160
10	tgtgcaacag agctattgat ctgtacaaga gatgtagtat agcattaatt acatgttatt	2220
	agataagggt acttatcctt gtttaattat tgtaaaaata gaagctgata ctatgtattc	2280
	tttgcatctg ttttcttacc agttatatat accctctggt ctgtttgagt actactagat	2340
	gtataaagaa tgcaattatt ctgacttctt ggtgttgggt tgaagttaga taagctatta	2400
	gtattattat ggttattcta aatctaatta tctgaaattg tgtgtctata tttgcttcag	2460
15	gggtgacata gttcaagtgg acacttgggt ttctggatca gggaagaatg gtatgcgtcg	2520
	tgattggctt ttacgtgact gcaaaactgg tgaaatcttg acaagagctt ccaggtagaa	2580
	atcattctct gtaattttcc ttccccttct cttctgcttc aagcaaattt taagatgtgt	2640
	atcttaatgt gcacgatgct gattggacac aattttaaat ctttcaaaca tttacaaaag	2700
	ttatggaacc ctttcttttc tctcttgaag atgcaaattt gtcacgactg aagtttgagg	2760
20	aaatcatttg aattttgcaa tggtaaaaaa gataatgaac tacatatttt gcaggcaaaa	2820
	acctctaatt gaacaaactg aacattgtat cttagtttat ttatcagact ttatcatgtg	2880
	tactgatgca tcaccttga gcttgtaatg aattacatat tagcattttc tgaactgtat	2940
	gttatggttt tggatgacta cagtgttttg gtcatgatga ataagctgac acggaggctg	3000
	tctaaaattc cagaagaagt cagacaggag ataggatctt attttgtgga ttctgatcca	3060
25	attctagaag aggataacag aaaactgact aaacttgacg acaacacagc ggattatatt	3120
	cgtaccggtt taagtgtatg tcaactagtt tttttgtaat tggtgtcatt aatttctttt	3180
	cttaaattat ttcataggtt gctttctaatt tagtttacat tatgtatctt cattcttcca	3240
	gtctaggttg agtgatctag atatcaatca gcatgtcaac aatgtgaagt acattgactg	3300
	gattctggag gtatttttct gttcttgtat tctaattcac tgcagtcctt gttttgttgt	3360
30	taaccaaagg actgtccttt gattgtttgc agagtgtccc acagccaatc ttggagagtc	3420
	atgagctttc ttccgtgact ttagagtata ggaggagtg tggtagggac agtgtgtctg	3480
	attccctgac tgctgtatct ggggccgaca tgggcaatct agctcacagt ggacatgttg	3540

	agtgcagca tttgcttcga ctcgaaaatg gtgctgagat tgtgaggggc aggactgagt	3600
	ggaggcccaa acctatgaac aacattgggtg ttgtgaacca gggtccagca gaaagcacct	3660
	aagattttga aatgggtaac gggtggagtt gcatcagtct ccttgctatg tttagactta	3720
	ttctggcctc tggggagagt tttgcttggtg tctgtccaat caatctacat atctttatat	3780
5	ccttctaatt tgtgttactt tgggtgggtaa gggggaaaag ctgcagtaaa cctcattctc	3840
	tctttctgct gctccatatt tcatttcacg tctgattgctg ctactgctag gctgtcttca	3900
	atattttaatt gcttgatcaa aatagctagg catgtatatt attattcttt tctcttggt	3960
	caattaaaga tgcaattttc attgtgaaca cagcataact attattctta ttatttttgt	4020
	atagcctgta tgcacgaatg acttgtccat ccaatacaac cgtgattgta tgctccagct	4080
10	cag	4083
	<210> 29	
	<211> 109	
	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
15	<220>	
	<223> íntron I de FATB-1	
	<400> 29	
	gtacgcaaac aaatctgcta ttcattcatt cattcctctt tctctctgat cgcaaactgc	60
	acctctacgc tccactcttc tcattttctc ttcctttctc gcttctcag	109
20	<210> 30	
	<211> 836	
	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<220>	
25	<223> íntron II de FATB-1	
	<400> 30	
	gttctcgatt cttttctctt ttaactttat ttttaaaata ataataatga gagctggatg	60
	cgtctgttcg ttgtgaatgt cgaggcaatg gggttctcat tttcgttaca gttacagatt	120
	gcattgtctg ctttctctct ctcccttggt tctttgcctt gtctgatttt tcgtttttat	180
30	ttcttacttt taatttttgg ggatggatat tttttctgca ttttttcggt ttgcgatggt	240
	ttcaggattc cgattccgag tcagatctgc gccggcttat acgacgaatt tgttcttatt	300
	cgcaactttt cgcttgattg gcttggttta cctctggaat ctacacgtg atcaaataag	360

	cctgctatatt tagttgaagt agaatttggt ctttatcgga aagaattcta tggatctggt	420
	ctgaaattgg agctactggt tcgagttgct atttttttta gtagtattaa gaacaagttt	480
	gcctttttatt ttacattttt ttcctttgct tttgccaaaa gtttttatga tcaactctctt	540
	ctgtttgtga tataactgat gtgctgtgct gttattatatt gttatttggg gtgaagtata	600
5	attttttggg tgaacttgga gcatttttag tccgattgat ttctcgatat catttaaggc	660
	taaggttgac ctctaccacg cgtttgcggt tgatgttttt tccatttttt ttttatctca	720
	tatcttttac agtgtttgcc tatttgcatt tctctctctt atcccccttc tgtggaaggt	780
	gggagggaaa atgtattttt ttttctctct ctaacttgcg tatattttgc atgcag	836
	<210> 31	
10	<211> 169	
	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<220>	
	<223> intron III de FATB-1	
15	<400> 31	
	gtaagtccgt cctcatataa gtgaatcttt atgatcttca gagatgagta tgctttgact	60
	aagatagggc tgttttattta gacactgtaa ttcaatttca tatatagata atatcattct	120
	gttggttactt ttcatactat atttatatca actatttgct taacaacag	169
	<210> 32	
20	<211> 525	
	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<220>	
	<223> intron IV de FATB-1	
25	<400> 32	
	gttagtcatc tagattcaac cattacatgt gatttgcaat gtatccatgt taagctgcta	60
	tttctctgtc tatttttagta atctttatga ggaatgatca ctctaaata tattcatggt	120
	aattattgag acttaattat gagaacaaa atgcttttga aatttgtctg ggatgaaaat	180
	tgattagata cacaagcttt atacatgatg aactatggga aaccttgtgc aacagagcta	240
30	ttgatctgta caagagatgt agtatagcat taattacatg ttattagata aggtgactta	300
	tccttgttta attattgtaa aaatagaagc tgatactatg tattctttgc atttgttttc	360
	ttaccagtta tatataccct ctgttctggt tgagtactac tagatgtata aagaatgcaa	420

	ttattctgac ttcttggtgt tgggttgaag ttagataagc tattagtatt attatggta	480
	ttctaaatct aattatctga aattgtgtgt ctatatttgc ttcag	525
	<210> 33	
	<211> 389	
5	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<220>	
	<223> íntron V de FATB-1	
	<400> 33	
10	gtagaaatca ttctctgtaa ttttccttcc cctttccttc tgcttcaagc aaattttaag	60
	atgtgtatct taatgtgcac gatgtgatt ggacacaatt ttaaattctt caaacattta	120
	caaaagttat ggaacccttt cttttctctc ttgaagatgc aaatttgtca cgactgaagt	180
	ttgaggaaat catttgaatt ttgcaatgtt aaaaaagata atgaactaca tattttgcag	240
	gcaaaaacct ctaattgaac aaactgaaca ttgtatctta gtttatttat cagactttat	300
15	catgtgtact gatgcatcac cttggagctt gtaatgaatt acatattagc attttctgaa	360
	ctgtatgtta tggttttggt gatctacag	389
	<210> 34	
	<211> 106	
	<212> DNA	
20	<213> Glycine max	
	<220>	
	<223> íntron VI de FATB-1	
	<400> 34	
	tatgtcaact agtttttttg taattggtgt catthaatttc ttttcttaaa ttatttcaga	60
25	tgttgctttc taattagttt acattatgta tottcattct tccagt	106
	<210> 35	
	<211> 82	
	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
30	<220>	
	<223> íntron VII de FATB-1	
	<400> 35	

	gtatTTTTct gttcttGtat tctaattccac tgcagtcctt gttttgttgt taaccaaagg	60
	actgtccttt gattgtttgc ag	82
	<210> 36	
	<211> 208	
5	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<220>	
	<223> 3'UTR de FATB-1	
	<400> 36	
10	gatttgaaat ggttaacgat tggagttgca tcagtctcct tgctatgttt agacttattc	60
	tggttccttg gggagagttt tgcttgtgtc tatccaatca atctacatgt ctttaaatat	120
	atacaccttc taatttgtga tactttggtg ggtaaggggg aaaagcagca gtaaattctca	180
	ttctcattgt aattaaaaaa aaaaaaaa	208
	<210> 37	
15	<211> 229	
	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<220>	
	<223> 5'UTR de FATB-1	
20	<400> 37	
	acaattacac tgtctctctc ttttccaaaa ttagggaaac aacaaggacg caaaatgaca	60
	caatagccct tcttcctgt ttccagcttt tctccttctc tctctctcca tcttcttctt	120
	cttcttcact cagtcagatc caactctca gataacacaa gaccaaaccg gctttttctg	180
	catttctaga ctagacgttc taccggagaa gcgaccttag aaattcatt	229
25	<210> 38	
	<211> 1398	
	<212> DNA	
	<213> Cuphea pulcherrima	
	<220>	
30	<223> gene de KAS I	
	<400> 38	
	atgcattccc tccagtcacc ctcccttcgg gctcccccgc tcgacctt cgcgcccaaa	60

	tcattccaccg tccgccccct ccaccgagca tcaattccca acgtccgggc cgcttccccc	120
	accgtctccg ctcccaagcg cgagaccgac cccaagaagc gcgtcgtgat caccggaatg	180
	ggccttgtct ccgttttcgg ctccgacgtc gatgcgtact acgacaagct cctgtcaggc	240
	gagagcgggg tgggccaat cgaccgcttc gacgcctcca agttccccac cagggttcggc	300
5	ggccagattc gtggcttcaa ctccatggga tacattgacg gcaaaaacga caggcggcctt	360
	gatgattgcc ttcgtactg cattgtcgcc gggaagaagt ctcttgagga cgccgatctc	420
	ggtgccgacc gcctctccaa gatcgacaag gagagagccg gagtgtgtgt tgggacagga	480
	atgggtggtc tgactgtctt ctctgacggg gttcaatctc ttatcgagaa gggtcaccgg	540
	aaaatcacc ctttcttcat cccctatgcc attacaaaca tggggtctgc cctgctcgct	600
10	attgaactcg gtctgatggg cccaaactat tcaatttcca ctgcatgtgc cacttccaac	660
	tactgcttcc atgctgtctc taatcatatc cgccgtgggt aggtgatctc tatgattgct	720
	ggaggcactg aggccgcaat cattccaatt ggggtgggag gctttgtggc ttgcagggct	780
	ctgtctcaaa ggaacgatga cctcagact gcctctaggc cctgggataa agaccgtgat	840
	ggttttgtga tgggtgaagg tgctggagtg ttggtgctgg agagcttgga acatgcaatg	900
15	aaacgaggag cacctattat tgcagagtat ttgggaggtg caatcaactg tgatgcttat	960
	cacatgactg acccaagggc tgatgggtctc ggtgtctcct cttgcattga gagtagcctt	1020
	gaagatgctg gcgtctcacc tgaagaggtc aattacataa atgctcatgc gacttctact	1080
	ctagctgggg atctcgccga gataaatgcc atcaagaagg ttttcaagaa cacaaaggat	1140
	atcaaaatta atgcaactaa gtcaatgatc ggacactgtc ttggagcctc tggaggtctt	1200
20	gaagctatag cgactattaa gggaataaac accggctggc ttcattccag cattaatcaa	1260
	ttcaatcctg agccatccgt ggagttcgac actggttgcca acaagaagca gcaacacgaa	1320
	gttaatgttg cgatctcgaa ttcatttgga ttcggaggcc acaactcagt cgtggctttc	1380
	tcggctttca agccatga	1398
	<210> 39	
25	<211> 1218	
	<212> DNA	
	<213> Cuphea pulcherrima	
	<400> 39	
	atgggtgtgg tgactcctct aggccatgac cctgatgttt tctacaataa tctgcttgat	60
30	ggaacgagtg gcataagcga gatagagacc tttgattgtg ctcaatttcc tacgagaatt	120
	gctggagaga tcaagtcttt ctccacagat ggttgggtgg ccccgagct ctctaagagg	180
	atggacaagt tcatgctata catgctgacc gctggcaaga aagcattaac agatggtgga	240

	atcaccgaag atgtgatgaa agagctagat aaaagaaaat gcggagttct cattggctca	300
	gcaatgggtg gaatgaaggt attcaatgat gccattgaag ccctaaggat ttcataaag	360
	aagatgaatc ccttttgtgt acctttcgct accacaaata tgggatcagc tatgcttgca	420
	atggacttgg gatggatggg gccaactac tcgatatcta ctgcttgtgc aacgagtaac	480
5	ttttgtataa tgaatgctgc gaaccatata atcagaggcg aagcagatgt gatgctttgc	540
	gggggctcag atgcggtaat catacctatt ggtatgggag gttttgttgc atgccgagct	600
	ttgtcccaga gaaattccga ccctactaaa gcttcaagac catgggacag taatcgtgat	660
	ggatttgtta tgggggaagg agctggagtg ctactactag aggagttgga gcatgcaaag	720
	aaaagagggtg cgactattta cgcagaattt ctaggtggga gtttcacttg cgatgcctac	780
10	cacatgaccg agcctcacc tgatggagct ggagtgattc tctgcataga gaaggctttg	840
	gctcagtcag gagtctctag ggaagacgta aattacataa atgcccatgc cacatccact	900
	ccggctggag atatcaaaga gtaccaagct cttatccact gtttcggcca aacagagag	960
	ttaaaagtta attcaaccaa atcaatgatt ggtcaccttc tcggagcagc cggtggtgtg	1020
	gaagcagttt cagtagttca ggcaataagg actgggtgga tccatccgaa tattaatttg	1080
15	gaaaaccag atgaaggcgt ggatacaaaa ttgctcgtgg gtcctaagaa ggagagactg	1140
	aacgttaagg tcggtttgtc taattcattt gggtttggtg ggcacaactc gtccatactc	1200
	ttcgccccctt acatctag	1218
	<210> 40	
	<211> 1191	
20	<212> DNA	
	<213> Ricinus communis	
	<220>	
	<223> Desaturase delta-9	
	<400> 40	
25	atggctctca agctcaatcc tttcctttct caaaccctaa agttaccttc tttcgctctt	60
	ccaccaatgg ccagtaccag atctcctaag ttctacatgg cctctaccct caagtctggt	120
	tctaaggaag ttgagaatct caagaagcct ttcatgcctc ctcgaggagt acatgttcag	180
	gttaccatt ctatgccacc caaaagatt gagatcttta aatccctaga caattgggct	240
	gaggagaaca ttctggttca tctgaagcca gttgagaaat gttggcaacc gcaggatttt	300
30	ttgccagatc ccgcctctga tggatttgat gagcaagtca gggaactcag ggagagagca	360
	aaggagattc ctgatgatta ttttgttgtt ttggttggag acatgataac ggaagaagcc	420
	cttcccactt atcaaacaat gctgaatacc ttggatggag ttcgggatga aacaggtgca	480

	agtcctactt cttgggcaat ttggacaagg gcatggactg cggaagagaa tagacatggt	540
	gacctctca ataagtatct ctacctatct ggacgagtgg acatgaggca aattgagaag	600
	acaattcaat atttgattgg ttcaggaatg gatccacgga cagaaaacag tccatacctt	660
	gggttcatct atacatcatt ccaggaaagg gcaaccttca tttctcatgg gaacactgcc	720
5	cgacaagcca aagagcatgg agacataaag ttggetcaaa tatgtggtac aattgctgca	780
	gatgagaagc gccatgagac agcctacaca aagatagtgg aaaaactctt tgagattgat	840
	cctgatggaa ctgttttggc ttttgctgat atgatgagaa agaaaatttc tatgcctgca	900
	cacttgatgt atgatggccg agatgataat ctttttgacc acttttcagc tgttgcgag	960
	cgtcttgag tctacacagc aaaggattat gcagatatat tggagttctt ggtgggcaga	1020
10	tggaagggtg ataaactaac gggcctttca gctgaggac aaaaggctca ggactatgtt	1080
	tgtcggttac ctccaagaat tagaaggctg gaagagagag ctcaaggaag ggcaaaggaa	1140
	gcacccacca tgcctttcag ctggattttc gataggcaag tgaagctgta g	1191
	<210> 41	
	<211> 1194	
15	<212> DNA	
	<213> <i>Simmondsia chinensis</i>	
	<220>	
	<223> Desaturase delta-9	
	<400> 41	
20	atggcggtga agcttcacca cacggccttc aatccttcca tggcggttac ctcttcggga	60
	cttctcgcg cgtatcacct cagatctcac cgcgttttca tggcttcttc tacaattgga	120
	attacttcta aggagatacc caatgccaaa aagcctcaca tgcctcctag agaagctcat	180
	gtgcaaaaaga ccattcaat gccgcctcaa aagattgaga ttttcaaadc cttggagggt	240
	tgggctgagg agaatgtctt ggtgcatctt aaacctgtgg agaagtgttg gcaaccacaa	300
25	gattttctac ccgaccggc ctccgaggga tttatggatc aagtcaagga gttgagggaa	360
	agaaccaaag aaatcccga tgagtacctt gtggtgttgg ttggcgatat gatcactgaa	420
	gaagctcttc cgacctacca gacgatgcta aacacgctcg atggagtacg tgatgagacg	480
	ggtgccagcc ttacttcttg ggctatctgg acccgggcat ggaccgctga agagaatagg	540
	cacggtgate ttttgaacaa gtatctttac cttactggtc gagttgacat gaagcagata	600
30	gagaagacaa tccagtatct aatcgatctt ggaatggacc ctcgaagtga aaacaacccc	660
	tatctaggct tcatctacac ttcttccaa gagagagcaa ctttcatctc ccatggaaac	720
	accgctaggc tcgccaaga ccacggcgac tttcaactag cacaagtatg tggcatcatc	780

	gctgcagatg agaagcgcca cgaaactgcc tacacaaaaa ttgtcgaaaa gctctttgaa	840
	atcgacccag acggcgctgt tctagcacta gctgacatga tgagaaagaa gggttccatg	900
	ccagcccact taatgtatga tggcaaagat gacaatctct ttgagaacta ctcagccgtc	960
	gctcaacaaa ttggagttaa caccgcgaag gactacgctg acatcctcga acacctcgtt	1020
5	aatcgctgga aagtcgagaa tttaatgggt ctgtctggcg agggacataa ggctcaagat	1080
	ttcgtatgtg gggttgcccc gaggatcagg aaactcgggg agagagctca gtcgctaagc	1140
	aaaccggtat ctcttgtccc cttcagctgg attttcaaca aggaattgaa gggt	1194
	<210> 42	
	<211> 2077	
10	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Contig de cDNA FATB-2	
	<400> 42	
15	gagggaaaca aggaagcgaa atgacacaat agtccttctt ccctgtttcc actttccagg	60
	ttttctcctt ctcgtttgtt gagcgctttt ctctccctct ccctcttctt cactcagtca	120
	gctgccgtag aaattcatta tgggtggcaac agctgcaact tcatcatttt tccctgttac	180
	ttcacctctg ccggactctg gtggacatgc aaagttactc aaaataatcg ctggccctat	240
	cacattattg ttaatatctt tcccttcttt accttctact ttccgaatcc agaaaacacc	300
20	acaacaccac ccagaattgt tgggttccat tctcaaaaca gagaacaaga agaagaagaa	360
	agagagagag tgaaaacggg aaaagcaaaa agttgtttct gtgattgatt ctctgcaacc	420
	gaatcatcat cagccacttc ttcccgtttc atctctccca tttcttcttt tcttccgctc	480
	tgggttcagta aggcgaagag gggttaacgtt attcataatg gttgcaacag ccgctacggc	540
	gtcgtttctt cccgtgcctt tgccagacgc tggaaaaggg aaaccaaga aactgggtgg	600
25	tgggtggcggg ggcggtggcg gttctgtgaa cctcggagga ctcaaacaga aacaagttt	660
	gtgcggtggc ttgcaggtca aggcaaacgc acaagcccct ccgaagaccg tggagaaggt	720
	tgagaatgat ttgtcgtcgt cgtcctcgtc gatttcgcac gccccgagga ctttcatcaa	780
	ccagttacct gactggagca tgcttctggc cgccatcacc accgtgttcc tggcggcgga	840
	gaagcagtgg atgatgctgg attggaagcc gcggcgcccc gacatgctca ttgacctt	900
30	tgggattggg aagatcgtgc aggatgggct tgtgttcagg cagaacttcc ccattaggtc	960
	ctatgagatt ggcgccgata aaaccgcgtc tatcgagact ttaatgaatc atttgagga	1020
	gactgcactt aatcatgtta agactgctgg gcttcttggg gatggatttg gttccacgcc	1080

	tgaaatgtgc aaaaagaacc tgatatgggt ggtgactaag atgcaggttg tggttgataa	1140
	atatcccaca tgggggtgatg ttgttcaagt agacacttgg gtatctgcat caggggaagaa	1200
	tggatatgtgt cgtgattggc ttgtgcgtga cgcgaaatct ggtgaaatct tgacaagagc	1260
	ctccagtgtt tgggtcatga tgaataaagt gacaagaaga ctgtctaaaa ttcccgaaga	1320
5	agtcagggca gagataagct cttattttgt ggactctgct ccagttgtgc cagaggataa	1380
	cagaaaacta accaaacttg atgaatccgc taatttcatt cgcactgggt taagtccag	1440
	atggaatgat ctagatgtga atcagcatgt taacaatgtg aagtatgttg ggtggattct	1500
	ggagagtgtc ccacagccac ttttggagag ccatgagctg tgtgcatga cattggagta	1560
	caggagggag tgtggcagga acagtgtgct ggattccctc tctgatctct ctggtgctga	1620
10	tgtaggaaac ttggcagatg gtggattttt tgagtgaag cacttgcttc gacttgatga	1680
	tgggtgctgag attgtgaggg gtaggactca atggaggccc aaacctttaa gcagcaactt	1740
	tggtcatgtt ttgagtcagg ttccagttcc agcagaaagc acctgaatct tatcttattg	1800
	attggcatca ctggaggagg agtggcataa attcatagag agctttgctt gtttttatca	1860
	aatctacgta tcttaaaata tatataaaag aaagtgtgtt actttggcta aaaaagggga	1920
15	ggggaagtag aaagtaaaaa aaaaaaaaaa aatctcgctc tcatgatttt gtaattaaaa	1980
	aatagctcct agcactactt tctcctacct gctccatttt ctgtttcact tatggttatg	2040
	ctgctgcttg gtgtcatcaa tatttaattg tttcatc	2077
	<210> 43	
	<211> 4634	
20	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<400> 43	
	ggaaacaagg aagcgaaatg acacaatagt ctttcttccc tgtttccact ttccaggttt	60
	tctccttctc gtttggtgag cgcttttctc tccctctccc tcttcttcac tcagtcaggt	120
25	acgctaacaa atctgctatt caatcaattc ctctttctct ctgatctacg tacgtgtccg	180
	caaactgcac ctccactctc cactcattcc atctaattct cctttttcgc ttcagagatc	240
	caactctca tataattcaa gacaaaatcc cgcgttttct gcatttctag acgttctacc	300
	ctacaagggt ctcgattctt cttttttctt tttttttaga ctattattat tttaaaaaaa	360
	taaaaataat aatgagagct ggatgcgtct gttcgttgtg aatttcgagg caatgggggt	420
30	ctgattttcg ttacagattg cattgtttgc tttcctctc tccgtttttt ctttgcttg	480
	tttttatttt taattttggg gatgttttcg gtcttgctt tgtttctgca ttttttttc	540
	ggtttgcgat gttttcagat ctgcgctggc ttatacgacg aatttgttct tattcgtgac	600

	tttccgcttg attgacctgt ttacacctg gaatctcaca cgtgatcaaa taaggctgct	660
	attttagttg aagtagaatc tatacacact ttgtagcatt ctttttacga tcacttacac	720
	gggtgggttt taatcaggct ttttttgtgg gggataaaac atcttctctc tcgattcttt	780
	ccgataaaaag cttaattgga ttataggaag tgggaaacaa tgcgtgggag ctctttgggt	840
5	tgtttttcgt aggttaaact tgcaggttta agttctgaat caggagttcc aaatatagag	900
	gctgggggca taaaaaaga gaattctatg gatctgttct gaaattggag ccaactgtttc	960
	gagttgctat ttttttacta gtattaataa gaacaagttt gctttttatt ttacattttt	1020
	tcccgtttct tttgccaaaa gtatttatga tcaactctct ctgtttgtga tattacttat	1080
	aagtgcgtg ctgtaattat ttgttatttg ggggaagta taatttttgg gtgaacttgg	1140
10	agcgttttta gttagattga tttctcgata tcatttaagg tttaggttga ccccttcac	1200
	tcgtttgtgg ttgattgttt tttttttttt atctcttctc atttacagtg cttctttgcc	1260
	tatttttttc attatcccct ttcgtaaaag gtaggagaag aaaaacaatg acttgcgtaa	1320
	attttgcattg cagctgccgt agaaattcat tatggtggca acagctgcaa cttcatcatt	1380
	ttccctgtt acttcaccct cgccggactc tgggtggacat gcaaagttac tcaaaataat	1440
15	cgctggccct atcacattat tgtaaatatt cttcccttct ttaccttcta ctttcgaat	1500
	ccagaaaaaca ccacaacacc acccagaatt gttgggttcc attctcaaaa cagagaacaa	1560
	gaagaagaag aaagagagag agtgaaaacg ggaaaagcaa aaagttgttt ctgtgattga	1620
	ttctctgcaa ccgaatcatc atcagccact tcttcccgtt tcatctctcc catttcttct	1680
	tttcttccgc tctggttcag taaggcgaag aggggttaacg ttattcataa tgggttgaac	1740
20	agccgctacg gcgtcgtttc ttcccgtgcc tttgccagac gctggaaaag ggaaacccaa	1800
	gaaactgggt ggtggtggcg gtggcggtgg cggttctgtg aacctcgag gactcaaaca	1860
	gaaacaaggt ttgtgcggtg gcttgcaggt caaggcaaac gcacaagccc ctccgaagac	1920
	cgtggagaag gttgagaatg atttgtcgtc gtcgtcctcg tcgatttcgc acgccccgag	1980
	gactttcatc aaccagttac ctgactggag catgcttctg gccgccatca ccaccgtgtt	2040
25	cctggcgcg gagaagcagt ggatgatgct ggattggaag ccgcgcgccc ccgacatgct	2100
	cattgacccc tttgggattg ggaagatcgt gcaggatggg cttgtgttca ggcagaactt	2160
	ccccattagg tcctatgaga ttggcgccga taaaaccgcg tctatcgaga ctttaatgaa	2220
	tcatttgcag gtcagctttt gcaaaaaatt gctgagaatt gcattcagca atcacgataa	2280
	atataacttt taataaatta ttatagaagt taagtaactt atcacgggtt gtcaacaaaa	2340
30	atthagagaa taattgcata ggacaaaact tacctacagt tcgtttgaca ttttttgtgt	2400
	cgtttttaaa tcaaaattaa aattttatct tggttaatttg cagattatta gatacaactc	2460
	caatttcgat caaagaacaa tgccaaaaac acctatggaa tctaagtttt gtgcaattgc	2520

	ttattgatga ttttatttta ttgcctaaat tgtctgtttt ccaaacagga gactgcactt	2580
	aatcatgtta agactgctgg gcttcttagt gatggatttg gttccacgct gaaatgtgca	2640
	aaaagaacct gatatgggtg gtgactaaga tgcaggttgt ggttgataaa tatcccacat	2700
	ggtaagttgg tgtgactaag aagaaccttt ttgatgtgtg aagaattgca aaggcgtcca	2760
5	tgctcagctg tgaaatcttc ttttgcctta ctcatcttta ctttgacttt atatagtatc	2820
	tggttgaatt attttgtact tctgcatttg tttctgtcac ttgtgctttt ttgtttcaca	2880
	aaattgggtat gatagttagg aacttgggat taaaggcatg tttggaatat attgtgattg	2940
	tgaattattt ttaaaaatat tttcactttt caaaatctat ctcatgaatc tgtaaaaata	3000
	agaataaaaa ataaaactac tgtaatgtgt ataaaaaatt cttcttggat ggtaattgat	3060
10	ctgataagca catgcttttt acataatgaa ttatatgaag tcctttgcct taagtctgtt	3120
	agactgggta tgagatatgg tagtaaattc tttttacatt ccgtacattt ttttgcatat	3180
	ttctgtctta ttattgtaaa atgttggatg catatacagg ttttcaaaag aagcaactta	3240
	taccatgtgc ccttttctgc attttggctt gtctgagaat aatctcttta gttaaattctg	3300
	aatctgttca tctgaagttg agtgaatcta tatttgcttc aggggtgatg ttgttcaagt	3360
15	agacacttgg gtatctgcat caggaagaa tggtatgtgt cgtgattggc ttgtgcgtga	3420
	cgccaaatct ggtgaaatct tgacaagagc ctccaggtag atatcagttt caggaatcct	3480
	ttttttctgt tgcctataga catgttttga agagtttttc tgaatctgaa tgtttctctc	3540
	tggtgatttg gcaactgctt taatctcacg aggctgtgtg aagttatcta ttatcatatt	3600
	tactttctct taatacacca ctattgaaag gcaattcatt acagatttaa gcatacaaaa	3660
20	ttttgttgat gataattttt taatctacca acagtatcta atatcttctt aatttgttat	3720
	taagtaccag ctttcaactt gtgtacatgt tgcaccttgg tgctacgaac ttataagcat	3780
	tttctgattg gttgagtttg attttgattt tgatgttatg cagtgttttg gtcattgatga	3840
	ataaagtgac aagaagactg tctaaaattc ccgaagaagt cagggcagag ataagctctt	3900
	attttgtgga ttctgctcca gttgtgccag aggataacag aaaactaacc aaacttgatg	3960
25	attcagctaa tttcattcgc actggtttaa gtcccagatg gaatgatcta gatgtgaatc	4020
	agcatgttaa caatgtgaag tatgttgggt ggattctgga gagtgtcca cagccacttt	4080
	tgagagacca tgagctgtgt gccatgacat tggagtacag gagggagtgt ggcaggaaca	4140
	gtgtgctgga ttccctctct gatctctctg gtgctgatgt aggaaacttg gcagatgggtg	4200
	gattttttga gtgcaagcac ttgcttcgac ttgatgatgg tgctgagatt gtgaggggta	4260
30	ggactcaatg gaggcccaaa cctttaagca gcaacttttg tcatgttttg agtcaggttc	4320
	cagttccagc agaaagcacc tgaatcttat cttattgatt ggcatcactg gaggaggagt	4380
	ggcataaaatt catagagagc tttgcttggt tttatcaaat ctacgtatct taaaatatat	4440

```

ataaaagaaa gtgtgttact ttggctaaaa aaggggaggg gaagtagaaa gtaaaaaaaaa 4500
aaaaaaaaat ctgcgtctca tgattttgta attaaaaaat agctcctagc actactttct 4560
cctacctgct ccattttctg tttaacttat ggttatgctg ctgcttggtg tcatcaatat 4620
ttaattgttt catc 4634

5 <210> 44
  <211> 1215
  <212> DNA
  <213> Glycine max
  <400> 44

10 gtacgctaac aaatctgcta ttcaatcaat tcctctttct ctctgatcta cgtacgtgtc 60
   cgcaaactgc acctccactc tccactcatt ccatctaatc ttcccttttc gcttcagaga 120
   tccaactcct catataattc aagacaaaaat cccgcgtttt ctgcatttct agacgttcta 180
   ccctacaagg ttctcgattc ttcttttttc ttttttttta gactattatt attttaaaaa 240
   aataaaaaata ataatgagag ctggatgcgt ctgttcgttg tgaatttcga ggcaatgggg 300

15 ttctgatttt cgttacagat tgcattgttt gctttctctc tctccgtttt ttctttgcct 360
   tgtttttatt tttaattttg gggatgtttt cggctctgcc tttgtttctg catttttttt 420
   tcggtttgcg atgttttcag atctgcgctg gcttatacga cgaatttggt cttattcgtg 480
   actttccgct tgattgacct gttttacctc tggaatctca cacgtgatca aataaggctg 540
   ctatttttagt tgaagtagaa tctatacaca ctttgtagca ttctttttac gatcacttac 600

20 acgggtgggt tttaatcagg ctttttttgt gggggtataa acatcttcct cctcgattct 660
   ttccgataaa agcttaattg gattatagga agtgggaaac aatgcgtggg agctcttttg 720
   tttgtttttc gtaggttaaa cttgcaggtt taagttctga atcaggagtt ccaaatatag 780
   aggctggggg cataaaaaaa gagaattcta tggatctggt ctgaaattgg agccactggt 840
   tcgagttgct atttttttac tagtattaat aagaacaagt ttgcttttta ttttacattt 900

25 tttcccgttt cttttgcaa agtatttat gatcactctc ttctgtttgt gatattactt 960
   ataagtgtcg tgctgtaatt atttgttatt tggggtgaag tataattttt ggggtgaactt 1020
   ggagcgtttt tagttagatt gatttctcga tatcatttaa ggtttaggtt gacccttcc 1080
   actcgtttgt gggtgattgt tttttttttt ttatctctta tcatttacag tgcttctttg 1140
   cctatttttt tcattatccc ctttcgtgaa aggtaggaga agaaaaacaa tgacttgcgt 1200

30 aaattttgca tgcag 1215
  <210> 45
  <211> 338

```

<212> DNA

<213> Glycine max

<400> 45

5 gtcagctttt gcaaaaaatt gctgagaatt gcattcagca atcacgataa atataacttt 60
 taataaatta ttatagaagt taagtaactt atcacgggtt gtcaacaaaa atttagagaa 120
 taattgcata ggacaaaact tacctacagt tcgtttgaca ttttttgtgt cgtttttaaa 180
 tcaaaattaa aattttatct tggtaatttg cagattatta gatacaactc caatttcgat 240
 caaagaacaa tgccaaaaac acctatggaa tctaagtttt gtgcaattgc ttattgatga 300
 ttttatttta ttgcctaaat tgtctgtttt ccaaacag 338

10 <210> 46

<211> 641

<212> DNA

<213> Glycine max

<400> 46

15 gtaagttggt gtgactaaga agaacctttt tgatgtgtga agaattgcaa aggcgtccat 60
 gctcagctgt gaaatcttct tttgccttac tcatctttac tttgacttta tatagtatct 120
 ggttgaatta ttttgtactt ctgcatttgt ttctgtcact tgtgcttttt tgtttcacia 180
 aattggtatg atagtttaga acttgggatt aaaggcatgt ttggaatata ttgtgattgt 240
 gaattatttt taaaaatatt ttcacttttc aaaatctatc tcatgaatct gtaaaaaataa 300
 20 gaataaaaaa taaaactact gtaatgtgta taaaaaattc ttcttgatg gtaattgatc 360
 tgataagcac atgcttttta cataatgaat tatatgaagt cctttgcctt aagtctgtta 420
 gactgggtat gagatatggt agtaaattct ttttacattc cgtacatttt tttgcatatt 480
 tctgtcttat tattgtaaaa tgttgatgc atatacaggt tttcaaaaga agcaacttat 540
 accatgtgcc cttttctgca ttttggtctg ttcgagaata atctcttttag taaattctga 600
 25 atctgttcat ctgaagttga gtgaatctat atttgcttca g 641

<210> 47

<211> 367

<212> DNA

<213> Glycine max

30 <400> 47

gtagatatca gtttcaggaa tccttttttt ctgttgctta tagacatggt ttgaagagtt 60
 tttctgaatc tgaatgttc tctctggtga tttggcactg cttttaatct cagaggctg 120

	tgtgaagtta tctattatca tatttacttt ctcttaatac accactattg aaaggcaatt	180
	cattacagat ttaagcatac aaaattttgt tgatgataat tttttaatct accaacagta	240
	tctaataatct tcttaatttg ttattaagta ccagccttca acttgtgtac atgttgacc	300
	ttgggtgctac gaacttataa gcattttctg attgggtgag tttgattttg attttgatgt	360
5	tatgcag	367
	<210> 48	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Sequência artificial	
10	<220>	
	<223> Iniciador de PCR	
	<400> 48	
	ctgtttccac tttccagg	18
	<210> 49	
15	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador de PCR	
20	<400> 49	
	cttctcgttt gttgagc	17
	<210> 50	
	<211> 16	
	<212> DNA	
25	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador de PCR	
	<400> 50	
	cagctgcaac ttcac	16
30	<210> 51	
	<211> 16	
	<212> DNA	

	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador de PCR	
	<400> 51	
5	cttccccatt aggtcc	16
	<210> 52	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Sequência artificial	
10	<220>	
	<223> Iniciador de PCR	
	<400> 52	
	cacttaatca tgttaaga	18
	<210> 53	
15	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador de PCR	
20	<400> 53	
	gtcgtgattg gcttgtg	17
	<210> 54	
	<211> 17	
	<212> DNA	
25	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador de PCR	
	<400> 54	
	ctctgctcca gttgtgc	17
30	<210> 55	
	<211> 18	
	<212> DNA	

	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador de PCR	
	<400> 55	
5	gcgagggtga agtaacag	18
	<210> 56	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Sequência artificial	
10	<220>	
	<223> Iniciador de PCR	
	<400> 56	
	gcacaaacct tgtttctg	18
	<210> 57	
15	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador de PCR	
20	<400> 57	
	caagaagccc agcagtc	17
	<210> 58	
	<211> 17	
	<212> DNA	
25	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador de PCR	
	<400> 58	
	gatttcacca gatttcg	17
30	<210> 59	
	<211> 17	
	<212> DNA	

	<213> Sequência artificial	
	<220>	
	<223> Iniciador de PCR	
	<400> 59	
5	gtgcgaatga aattagc	17
	<210> 60	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Sequência artificial	
10	<220>	
	<223> Iniciador de PCR	
	<400> 60	
	ctttctgctg gaactgg	17
	<210> 61	
15	<211> 2683	
	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<220>	
	<223> FAD3-1B gene	
20	<400> 61	
	gttcaagcac agcctctaca acatgttgggt aatgggtgcag ggaaagaaga tcaagcttat	60
	tttgatccaa gtgctccacc acccttcaag attgcaaata tcagagcagc aattccaaaa	120
	cattgctggg agaagaacac attgagatct ctgagttatg ttctgaggga tgtgttggtg	180
	gtgactgcat yggtagctgc agcaatcggc ttcaatagct ggttcttctg gccactctat	240
25	yggcctgcac aaggcacaat gttttgggca ctttttggtc ttggacatga ttggttaacta	300
	attattatta caaattgtta tgttatgtta tgttatgttg ttgtgccttt ttctcagtga	360
	tgcttttagtc atttcatttc acttgggttat gcatgattgt tcgttcatat gttctgtcat	420
	ggtgagttct aatttgattg atgcatggaa cagtgggtcat ggaagttttt caaacagtcc	480
	tttgttgaac agcattgtgg gccacatctt gcactcttca attcttgtac cataccatgg	540
30	atggtcggtt ccttttagca acttttcatg ttcactttgt ccttaaattt ttttttatgt	600
	ttgttaaaaa atctttggtc tgatttaaca acctaaccat ttttacaacw catggatttw	660
	ttgcaggaga attagccaca ggactcacca tcagaaccat ggccatgttg agaaggatga	720

	atcatggggtt	ccggtattac	tatgagtttg	cttgattaat	ttccacattt	tttctttctt	780
	cttaatttta	atcagtgggtt	agatttggtt	gtgttccaat	agaagaaaag	ggggtatcta	840
	gagagatgtg	aatttcacga	agtggttcat	gattatgtgt	ctttatgcct	ttatgtcagc	900
	ttacagagaa	agtttacaag	aatctagaca	acatgacaag	aatgatgaga	ttcactcttc	960
5	ctttcccat	ctttgcatac	cccttttatt	tggtgagacc	ctctttttcc	agaatgacag	1020
	cattatttta	ctatatagta	cctcaatttt	tatatattcta	aaattttgaa	ttcttgaaat	1080
	tgaaagggaa	ggacttttatt	gggtctagca	tctcactctc	tctttgtgat	atgaaccata	1140
	tatttcagtg	gagcagaagc	cctggaaaag	aaggctctca	tttcaaccct	tacagcaact	1200
	tgttctctcc	tggtgagaga	agagatgtgc	taacttcaac	tctgtgttgg	ggcatcatgc	1260
10	tttctgtgct	tctctatctt	tccctcacia	tggtgccact	ttttatgctc	aagctctatg	1320
	gggttcctta	tttggttaac	tcactctcac	actttcttta	tacatcgca	accagtgtgg	1380
	gttatttgca	acctacaccg	aagtaatgcc	ctataattaa	tgaggttaac	acatgtccaa	1440
	gtccaatatt	ttgttcactt	atttgaactt	gaacatgtgt	agatcttcgt	catgtggctg	1500
	gatttcgtca	cgtacttgca	tcacatgggt	tacaagcaga	aactgccttg	gtaccgtggc	1560
15	caggtatccc	atttaacaca	atttgtttca	ttaacatttt	aagagaattt	ttttttcaaa	1620
	atagttttcg	aaattaagca	aataccaagc	aaattgttag	atctacgctt	gtacttgttt	1680
	taaagtcaaa	ttcatgacca	aattgtcttc	acaagtccaa	accgtccact	attttatttt	1740
	cacctacttt	atagcccaat	ttgtcatttg	gttacttcag	aaaagagaac	cccatttgta	1800
	gtaaatatat	tatttatgaa	ttatggtagt	ttcaacataa	aacatattta	tgtgcagttt	1860
20	tgccatcctt	caaaagaaga	tagaaactta	ctccatgtta	ctctgtctat	atgtaatttc	1920
	acaggaatgg	agttatctaa	ggggtgggtc	tacaacagta	gatcgcgact	atgggtggat	1980
	caacaacatt	caccatgaca	ttggcaccca	tggtatccat	caccttttcc	ctcaaattcc	2040
	acattatcat	ttaatcgaag	cgggtattaat	tctctatttc	acaagaaatt	attgtatgtc	2100
	tgccatgtg	atctaagtca	attttcacat	aacacatgat	caaactttct	taattctttc	2160
25	ttctaaattg	aaaaagtggg	ttatatgtca	attgaaaatt	ggtcaagacc	acaaacatgt	2220
	gatgatctcc	caccttacat	ataataattt	ctcctattct	acaatcaata	atccttctat	2280
	ggctctgaat	tggttccttt	ttttttcatt	ttcttattct	ttttgttgtc	ccacaataga	2340
	ctaaagcagc	aaaggcagtg	ctaggaaagt	attatcgtga	gcctcagaaa	tctgggccat	2400
	tgccacttca	tctaataaag	tacttgctcc	acagcataag	tcaggatcac	ttcggttagcg	2460
30	actctggcga	cattgtgtac	taccagactg	attcccagct	ccacaaagat	tcttggaacc	2520
	agtccaacta	aagtttttga	tgctacattt	acctattttc	ctcttaaata	ctatttccta	2580
	tgtaatatgt	aatttagaat	atgttaccta	ctcaaatcaa	ttaggtgaca	tgtataagct	2640

ttcataaaatt atgctagaaa tgcacttact ttacaaagca tgc 2683
 <210> 62
 <211> 4160
 <212> DNA
 5 <213> Glycine max
 <220>
 <223> gene de FAD3-1C
 <400> 62
 aaagatttca ttcttctctt tctaggttat tacgcaccac ccaccacgta tccctgaaag 60
 10 agagaaaaac acactaagcc aaagccaaag cagcaatggt taaagacaca aagccttttag 120
 cctatgctgc taataatgga taccaaaagg aagcttttga tccagtgct cctccaccgt 180
 ttaagattgc agaaatcaga gttgcaatac caaaacattg ctgggtcaag aatccatgga 240
 gatccctcag ttatgttctc agggatgtgc ttgtaattgc tgcattgatg gctgctgcaa 300
 gtcacttcaa caactggctt ctctggctaa tctattggcc cattcaagga acaatgttct 360
 15 gggctctgtt tggtcttgga catgattggt aattaattat ttgttggttac ttttttgtaa 420
 taatatgaat ctcacacact gctttgttat gcctacctca tttcatttgg ctttagacaa 480
 cttaaatttg agatctttat tatgtttttt gcttatatgg taaagtgatt cattcttcac 540
 attgaattga acagtggcca tggaagcttt tcagacagcc cttttctaaa tagcctggtg 600
 ggacacatct tgcattcctc aattcttgtg ccataccatg gatgggttagt tcatcccggc 660
 20 ttttttgttt gtcattggaa gttcttttat tgattcaatt tttatagcgt gttcggaaac 720
 gcgtttcaga aaataatgaa atacatcttg aatctgaaag ttataacttt tagcttcatt 780
 gtcattgaaa gttcttttat taattatatt tttattgcgt gtttggaatc ccatttgaga 840
 aataagaaat caggttttaa atgtgaaagt tataactatt aacttttgac taaacttgaa 900
 aaaatcacat ttttgatgtg gaaccaaatc tgatttgaga accaagttga ttttgatgga 960
 25 ttttgcagga gaattagcca cagaactcac catcaaaatc atggacacat tgagaaggat 1020
 gaatcctggg ttccagtatg tgattaacta ctctctctat agttattttt gattcaatta 1080
 aatttattta ttttaataagt tcaagaaaaa aggaatcttt atacttcatg ataaagctgt 1140
 tcttgaacat ttttttttgt cattatctta gttaaccgag aagatttaca agaacttaga 1200
 caacatgaca agacttgta gattcactgt gccatttcca ttgtttgtgt atccaattta 1260
 30 tttggkgagk gctttttttt ttttacttgg aagactacaa cacattatta ttattataat 1320
 atggttcaaa tcaatgactt ttaatttctt tgtgatgtgc actccatttt cagttctcaa 1380
 gaagccccgg aaaggaaggt tctcatttca atccctacag caatctgttc ccaccagtg 1440

	agagaaaggg aatagcaata tcaacactgt gttgggttac catgttttct atgcttatct	1500
	atctctcctt cataactagt ccagttctat tgctcaagct ctatggaatt ccatattggg	1560
	taattaaatt actcttacat tactttttcc tctttttttt tatgggtcct aactagtatc	1620
	acaaaaatat tgggttaaaaa attttaaaaa aatattttatt atgtaaatca taaaagaaca	1680
5	taaaaaaaaat gatgaataac ataattttcg tctcttatta aaaatatttt tatttttaaat	1740
	ttcttaataca atatatttaa aatctgggta acattttttg aatatttcaa ttctccaatt	1800
	aaaaatttga aatagtcacc attaattatg taattgtttg aacacgtgca gatatttgtt	1860
	atgtggctgg actttgtcac atacttgcac caccatgggc atcatcagaa actgccttgg	1920
	tatcgcgga aggtaacaaa aataaataga aaatagtgag tgaacactta aatgttagat	1980
10	actaccttct tcttcttctt tttttttttt ttgagggtta tgctagataa tagctagaaa	2040
	gagaaagaaa gacaaatata ggtaaaaata aataatataa cctgggaaga agaaaacata	2100
	aaaaaagaaa taatagagtc tacgtaatgt ttggattttt gaggtaaatg gtgttcacct	2160
	accattactc aaagattctg ttgtctacgt agtggttggc ctttggagtg aaatggtgtt	2220
	cacctaccat tactcagatt ctgttggtgc ccttagttac tgtcttatat tcttagggta	2280
15	tattctttat ttacatcct ttccacatct tacttkaaaa gatttttaat tattcattga	2340
	aatattaacg tgacagttaa attaaaaata taaaaaatc gttaaaactt caaataaata	2400
	agagtgaag gatcatcatt tttcttctt cttttattgc gttattaatc atgcttctct	2460
	tctttttttt cttcgcttcc caccatatac aaattcatgt gaagtatgag aaaatcacga	2520
	ttcaatggaa agctacagga actttttttg ttttgttttt ataatcggaa ttaatttata	2580
20	ctccattttt tcacaataaa tgttacttag tgccttaaag ataattttg aaaaattaaa	2640
	aaaattatta atacactgta ctactatata atatttgaca tatatttaac atgattttct	2700
	attgaaaatt tgtatttatt attttttaac caaaacccat aaggcattaa ttacaagac	2760
	ccatttttca tttatagctt tacctgtgat catttatagc ttttaaggac ttagatgtta	2820
	caatcttaat tacaagtaaa tatttatgaa aaacatgtgt cttacccctt aaccttacct	2880
25	caacaaagaa agtgtgataa gtggcaacac acgtgttgct tttttggccc agcaataaca	2940
	cgtgtttttg tgggtgacaa aaatggacag gaatggagtt atttaagagg tgggtctaca	3000
	actgtggatc gtgactatgg ttggatcaat aacattcacc atgacattgg caccatgtt	3060
	attcaccatc tttccctca aattcctcat tatcacctcg ttgaagcggg atattttact	3120
	attattactc acctaaaaag aatgcaatta gtacatttgt tttatctctt ggaagttagt	3180
30	cattttcagt tgcattgatt taatgttctc tctattttta aaccatgttt tcacacctac	3240
	ttcgtttaaa ataagaatgt ggatactatt ctaatttcta ttaacttctt ttaaaaaata	3300
	atgtaaaact agtattaaaa aagaggaaat agattacact ctactaatac taatagtata	3360

	aaaaaatta cattgttatt ttatcacaaa taattatata taattaattt ttacaatcat	3420
	tatcttaaaa gtcattgtatg atatacagtt ttacatgct ttggtactta ttgtaaagtt	3480
	agtgatttat tcattattta tgttatataa ttggcataaa tatcatgtaa ccagctcact	3540
	atactataat gggaacttgg tggtgaaagg ggtttacaac cctcttttct aggtgtaggt	3600
5	gctttgatac ttctgggtccc tttttatatac aatataaatt atattttgct gataaaaaaa	3660
	acattattaa tatataatca ttaacttctt taaaaaccgt acctaaaact ttatattatt	3720
	aaaagaaga ttgagatcag caaaagaaaa aaaaattaac agtcatttga attcactgca	3780
	gacacaagca gcaaaatcag ttcttggaga gtattaccgt gagccagaaa gatctgcaca	3840
	ttaccatttc atctaataaa gtatttaatt cagagtatga gacaagacca cttcgtaagt	3900
10	gacactggag atgtgggttta ttatcagact gattctctgc accttactc gcaccgagac	3960
	tgagtttcaa tttttgggtt atttattgga ttctagctac tcaaattact ttttttttaa	4020
	tgttacgttt ttggagtttt aacgttttct gaacaacttg caaattacat gcatagagag	4080
	acaggaattc atagtgggcc tcaatggaat atttatttga aattagtaag gtggttaatta	4140
	ataaatattg aattgtcagt	4160
15	<210> 63	
	<211> 994	
	<212> DNA	
	<213> Glycine max	
	<220>	
20	<223> promotor de FAD3-1C	
	<400> 63	
	tgctacgaag caatttgcatt gctaggaagc aaagtaaaat tctcaaactg tataacttat	60
	tttctcttgt tgtatataaa actagtcatt ttctattaaa aagcattgta taatagttta	120
	atgggtcatt gaaattatta taattaatgt cattctattt ttaatactcc ttttgtttga	180
25	taatgattat cgtttcatgt tattttctat acatatcaag acaaattaat aaatggataa	240
	aaaagtatca attttataaa attaataatta ttattattaa tttatttata attttttgtt	300
	atcatttata ttataagtaa tatattattg gcaaaaataa tttttgatca attatattta	360
	cctgtcggtc gaactctaga ttatgctggg tatcttctcc aaatgaatcc aaagattaaa	420
	ataaaataaa attataagta atataaataa aaaacaatta atactagatt aacaagacta	480
30	aaataataat tattttataa tttattttct tcaataattg tagaatacaa ggagtaatat	540
	ttaatgttgt ttaattcttg tttcaataat tgagatgttt tgaacaaatt aaataattat	600
	tgtaaataga ataacattaa ttacaataat aaaatcattt taacgatcca ttaaacttaa	660

	atgataaaat tcaactaact aatttgaggt aattaagaaa aatagttaat ttagacaaca	720
	atattaaatt ttgctaaat tatatgtttt tctcaaaatt acctataaca ttaataagac	780
	atacttttat tttcaaaga tttctactta attaaccgcc acaaattcat cctcgctggt	840
	ttgtcctaca ccgtatgttt ttgacgtca gctaggcaaa ccaacataaa taggaagcag	900
5	tagaagtaaa agtagaatgt gtagtggtta ttattattta ctactgtttc accttggtgt	960
	tatataaatg cactaccca taattgaatt tttc	994

REIVINDICAÇÕES

1. Método de produzir uma planta de soja compreendendo um teor de ácido linolênico menor do que cerca de 6% de ácidos graxos de semente totais em peso e um teor de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso, compreendendo as etapas de:

a) criar uma ou mais plantas de soja que compreendem um transgene que diminui a expressão de um gene FAD2-1 de soja endógena e pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene FAD3 de soja endógena;

b) obter pelo menos uma semente da referida planta de soja obtida na etapa (a);

c) determinar uma percentagem do teor de ácido graxo de semente total em peso de ácido linolênico e ácido oléico para a referida semente de etapa (b); e,

d) identificar uma planta de soja que produz semente tendo uma composição de ácido graxo de semente compreendendo um teor de ácido linolênico menor do que cerca de 6% de ácidos graxos de semente totais em peso e um teor de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as referidas plantas de soja que são criadas na etapa (a) compreendem pelo menos duas perdas de mutações de função em pelo menos dois genes FAD3 de soja endógena.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que os referidos genes de FAD3 de soja endógena são FAD3-1 B e FAD3-1 C.

4. Método de acordo com a reivindicação 2, em que a referida planta de soja identificada na etapa 3 compreende um teor de ácido linolênico menor do que cerca de 3% de ácidos graxos de semente totais em peso e um teor de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida

planta de soja é criada na etapa (a) por :

i) cruzamento de uma primeira linhagem origem de soja compreendendo o referido transgene, com uma segunda linhagem origem de soja compreendendo pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene FAD3 de soja endógena para obter uma planta de soja F1 que seja heterozigoto para o referido transgene e heterozigoto para pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3; e

ii) fertilização cruzada contínua de plantas de progênie F1 de (i) para obter uma planta de soja F2 que é homozigoto para o referido transgene e homozigota para pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3, desse modo obtendo uma planta de soja compreendendo tanto um transgene que diminui a expressão de um gene FAD2-1 de soja endógena e pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene FAD3 de soja endógena.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, em que a referida segunda linhagem origem de soja compreende pelo menos duas mutações de perda de função em pelo menos dois genes FAD3 de soja endógena.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que os referidos genes de FAD3 de soja endógenas são FAD3-1B e FAD3-1C.

8. Método de acordo com a reivindicação 5, em que a referida planta de soja F1 que seja heterozigoto para o referido transgene e para pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3 é obtida na etapa (i) submetendo uma pluralidade de plantas F1 a pelo menos uma técnica de análise de DNA permitindo a identificação de uma planta F1 que seja heterozigoto para o referido transgene e para pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3.

9. Método de acordo com a reivindicação 5, em que a referida planta de soja F2 que é homozigota para o referido transgene e homozigoto para pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3 é obtida na etapa (ii) submetendo uma pluralidade de plantas F2 a pelo menos uma técnica de análise de DNA permitindo identificação de uma planta F2 que é homozigoto para o referido transgene e homozigoto para pelo menos

uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3.

10. Método de acordo com a reivindicação 8, em que a referida técnica de análise de DNA compreende uma ou mais técnicas selecionadas do grupo consistindo em análise de PCR, análise quantitativa de PCR, análise de SNP, análise de AFLP, análise de RFLP e análise de RAPD.

11. Método de acordo com a reivindicação 9, em que a referida técnica de análise de DNA compreende uma ou mais técnicas selecionadas do grupo consistindo em análise de PCR, análise quantitativa de PCR, análise de SNP, análise de AFLP, análise de RFLP e análise de RAPD.

12. Método de acordo com a reivindicação 8, em que a referida técnica de análise de DNA compreende a detecção de pelo menos um único polimorfismo de nucleotídeo em uma posição na sequência de gene de FAD3-1 C correspondendo ao nucleotídeo 687, 1129, 1203, 2316, 3292, 3360 ou 3743 de SEQ ID NO:62, detecção de uma deleção no gene FAD3-1 C de SEQ ID NO:62, ou detecção de pelo menos um único polimorfismo de nucleotídeo em uma sequência promotora de FAD3-1 C de soja correspondendo a uma guanina no nucleotídeo 334, uma citosina no nucleotídeo 364, uma timina no nucleotídeo 385, uma adenina no nucleotídeo 387, uma citosina no nucleotídeo 393, uma guanina no nucleotídeo 729 e uma citosina no nucleotídeo 747 de SEQ ID NO:63.

13. Método de acordo com a reivindicação 9, em que a referida técnica de análise de DNA compreende a detecção de pelo menos um único polimorfismo de nucleotídeo em uma posição na sequência de gene de FAD3-1 C correspondendo ao nucleotídeo 687, 1129, 1203, 2316, 3292, 3360 ou 3743 de SEQ ID NO:62, detecção de uma deleção no gene FAD3-1 C de SEQ ID NO:62, ou detecção de pelo menos um único polimorfismo de nucleotídeo em uma sequência promotora de FAD3-1C de soja correspondendo a uma guanina no nucleotídeo 334, uma citosina no nucleotídeo 364, uma timina no nucleotídeo 385, uma adenina no nucleotídeo 387, uma citosina no nucleotídeo 393, uma guanina no nucleotídeo 729 e uma citosina no nucleotídeo 747 de SEQ ID NO:63.

14. Método de acordo com a reivindicação 8, em que a referida

técnica de análise de DNA compreende a detecção de um único polimorfismo de nucleotídeo no referido gene de FAD3-1B de soja compreendendo uma substituição de um resíduo de timina para um resíduo de citosina em uma posição na sequência de gene de FAD3-1B correspondendo ao nucleotídeo 2021 de SEQ ID NO:61.

15. Método de acordo com a reivindicação 9, em que a referida técnica de análise de DNA compreende a detecção de mutação no referido gene de FAD3-1 B de soja compreendendo uma substituição de um resíduo de timina para um resíduo de citosina em uma posição na sequência de gene de FAD3-1B correspondendo ao nucleotídeo 2021 de SEQ ID NO:61.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o referido transgene também compreende um transgene que confere tolerância ao herbicida.

17. Método de acordo com a reivindicação 5, em que o referido transgene também compreende um transgene que confere tolerância ao herbicida e em que a referida planta de soja F1 que seja heterozigoto para o referido transgene é obtida na etapa (i) submetendo uma pluralidade de plantas F1 à seleção de herbicida para o referido transgene.

18. Método de acordo com a reivindicação 5, em que o referido transgene também compreende um transgene que confere tolerância ao herbicida e em que uma pluralidade de plantas F2 enriquecidas para plantas de soja F2 que são homozigotos para o referido transgene é obtida na etapa (ii) submetendo a referida pluralidade de plantas F2 à seleção de herbicida para o referido transgene.

19. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o referido herbicida é glifosato.

20. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o referido transgene compreende sequências localizadas entre as sequências limítrofes de T-DNA de pMON68504, pCGN5469, pCGN5471, ou pCGN5485 que são integradas em um cromossoma da referida planta.

21. Método de acordo com a reivindicação 1, a referida planta de soja é criada na etapa (a) por:

a) transformação de uma planta de soja ou célula de planta de soja compreendendo pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene FAD3 de soja endógena com um transgene que diminui a expressão de gene FAD2-1 de soja endógena para obter uma planta de soja R0 com
5 pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3 que seja heterozigoto para o referido transgene;

b) fertilização cruzada contínua da referida planta de progênie R0 de (i) para obter uma planta de soja R1 que é homozigoto para o referido transgene e homozigoto para pelo menos uma mutação de perda-de-função
10 em um gene de FAD3, desse modo obtendo uma planta de soja compreendendo o transgene que diminui a expressão de um gene FAD2-1 de soja endógena e pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene FAD3 de soja endógena.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, em que o referido
15 transgene também compreende seqüências que conferem uma característica de tolerância ao herbicida .

23. Método de acordo com a reivindicação 22, em que o referido herbicida é glifosato.

24. Método de acordo com a reivindicação 5, também
20 compreendendo a etapa iii) fertilização cruzada contínua da referida progênie F2 que é homozigoto para o referido transgene e homozigoto para pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3 de (ii) para obter uma planta de soja F3.

25. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida
25 percentagem do teor de ácido graxo de semente total em peso de ácido linolênico e ácido oléico é determinada na etapa (c) por uma técnica de análise de lipídeo.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, em que a referida
30 técnica de análise de lipídeo compreende uma ou mais técnicas selecionadas do grupo consistindo em detecção de cromatografia de gás/ionização de chama, cromatografia de gás/espectroscopia de massa, detecção de cromatografia de camada fina/ionização de chama,

cromatografia líquida/espectrometria de massa, cromatografia líquida/ionização por eletrovaporização - espectrometria de massa e cromatografia líquida/ionização por eletrovaporização - espectroscopia aleatória de massa.

5 27. Planta de soja produzida por um método como definido na reivindicação 1.

28. Parte da planta da planta de soja como definida na reivindicação 27.

29. Parte de planta de acordo com a reivindicação 28, em que a
10 referida parte da planta é pólen, um óvulo, um meristema, uma folha, um caule, uma raiz, ou uma célula.

30. Planta de soja de progênie da planta de soja como definida na reivindicação 27.

31. Semente da planta de soja produzida por um método como
15 definido na reivindicação 1, a referida semente tendo uma composição de ácido graxo compreendendo um teor de ácido linolênico menor do que cerca de 6% de ácidos graxos de semente totais em peso e um teor de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso.

20 32. Semente da planta de soja produzida por um método como definido na reivindicação 4, a referida semente tendo uma composição de ácido graxo compreendendo um teor de ácido linolênico menor do que cerca de 3% de ácidos graxos de semente totais em peso e um teor de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais
25 em peso.

33. Método de obter uma planta de soja com uma composição de ácido graxo de óleo de semente alterada compreendendo as etapas de :

a) cruzamento de uma primeira linhagem origem de soja tendo uma composição de ácido graxo de óleo de semente compreendendo um
30 teor de ácido linolênico menor do que cerca de 3% do total de ácidos graxos em peso com uma segunda linhagem origem de soja tendo uma composição de ácido graxo de óleo de semente onde o teor de pelo menos um ácido

graxo exceto ácido linoléico é alterado em pelo menos 50% quando comparado ao correspondente teor de ácido graxo de um óleo de soja de utilidade, a referida segunda linhagem origem de soja compreendendo um transgene que altera o teor de pelo menos um ácido graxo exceto ácido linoléico; e

b) obtenção de uma planta de progênie exibindo uma composição de ácido graxo de óleo de semente compreendendo um teor de ácido linolênico menor do que 3% do total de ácidos graxos em peso e um teor de pelo menos um ácido graxo exceto ácido linoléico que é alterado em pelo menos 50% quando comparado ao correspondente teor de ácido graxo de um óleo de soja de utilidade, desse modo obtendo uma planta de soja com uma composição de ácido graxo de óleo de semente alterada.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, em que o referido ácido graxo exceto ácido linolênico é selecionado do grupo consistindo em ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido estearidônico, ácido oléico, ácido linoléico, ácido γ -linoléico, ácido eicosapentaenóico e ácido docosaexaenóico.

35. Método de acordo com a reivindicação 24, em que o referido ácido graxo exceto ácido linolênico é selecionado do grupo consistindo em ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido estearidônico, ácido oléico, ácido linoléico, ácido γ -linoléico, ácido eicosapentaenóico e ácido docosaexaenóico.

36. Método de produzir uma planta de soja compreendendo um teor de ácido linolênico menor do que cerca de 6% de ácidos graxos de semente totais em peso, um teor de ácido graxo saturado menor do que cerca de 8% em peso e um teor de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso, compreendendo as etapas de :

a) criar uma ou mais plantas de soja que compreendam pelo menos um transgene que diminui a expressão tanto de um gene FAD2-1 de soja endógeno, quanto um FATB endógeno, e pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene FAD3 de soja endógena;

b) obter pelo menos uma semente da referida planta de soja obtida na etapa (a);

c) determinar uma percentagem do teor de ácido graxo de semente total em peso de ácido linolênico, ácidos graxos saturados e ácido oléico para a referida semente de etapa (b); e,

d) identificar uma planta de soja que produz semente tendo uma composição de ácido graxo de semente compreendendo um teor de ácido linolênico menor do que cerca de 6% de ácidos graxos de semente totais em peso, um teor de ácido graxo saturado menor do que cerca de 8% em peso, e um teor de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, em que as referidas plantas de soja que são criadas na etapa (a) compreendem pelo menos duas perdas de mutações de função em pelo menos dois genes FAD3 de soja endógena.

38. Método de acordo com a reivindicação 37, em que os referidos genes de FAD3 de soja endógenas são FAD3-1B e FAD3-1C.

39. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a referida planta de soja identificada na etapa 3 compreende um teor de ácido linolênico menor do que cerca de 3% de ácidos graxos de semente totais em peso, um teor de ácido graxo saturado menor do que cerca de 8% em peso e um teor de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso.

40. Método de acordo com a reivindicação 36, em que a referida planta de soja é criada na etapa (a) por :

i) cruzamento de uma primeira linhagem origem de soja compreendendo o referido transgene, com uma segunda linhagem origem de soja compreendendo pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene FAD3 de soja endógena para obter uma planta de soja F1 que seja heterozigoto para o referido transgene e heterozigoto para pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3; e

ii) fertilização cruzada contínua de plantas de progênie F1 de (i)

para obter uma planta de soja F2 que é homozigoto para o referido transgene e homozigoto para pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3, desse modo obtendo uma planta de soja compreendendo pelo menos um transgene que diminui a expressão tanto de um gene FAD2-1 de soja endógena, quanto um FATB endógeno e pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene FAD3 de soja endógena.

41. Método de acordo com a reivindicação 40, em que a referida planta de soja F1 que seja heterozigoto para o referido transgene e para pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3 é obtida na etapa (i) submetendo uma pluralidade de plantas F1 a pelo menos uma técnica de análise de DNA permitindo identificação de uma planta F1 que seja heterozigota para o referido transgene e para pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3.

42. Método de acordo com a reivindicação 40, em que a referida planta de soja F2 que é homozigoto para o referido transgene e homozigoto para pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3 é obtida na etapa (ii) submetendo uma pluralidade de plantas F2 a pelo menos uma técnica de análise de DNA permitindo identificação de uma planta F2 que é homozigoto para o referido transgene e homozigoto para pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3.

43. Método de acordo com a reivindicação 41, em que a referida técnica de análise de DNA compreende a detecção de pelo menos um único polimorfismo de nucleotídeo em uma posição na sequência de gene de FAD3-1 C correspondendo ao nucleotídeo 687, 1129, 1203, 2316, 3292, 3360 ou 3743 de SEQ ID NO:62, detecção de uma deleção no gene FAD3-1 C de SEQ ID NO:62, ou detecção de pelo menos um único polimorfismo de nucleotídeo em uma sequência promotora de FAD3-1C de soja correspondendo a uma guanina no nucleotídeo 334, uma citosina no nucleotídeo 364, uma timina no nucleotídeo 385, uma adenina no nucleotídeo 387, uma citosina no nucleotídeo 393, uma guanina no nucleotídeo 729 e uma citosina no nucleotídeo 747 de SEQ ID NO:63.

44. Método de acordo com a reivindicação 42, em que a referida técnica de análise de DNA compreende a detecção de pelo menos um único polimorfismo de nucleotídeo em uma posição na sequência de gene de FAD3-1 C correspondendo ao nucleotídeo 687, 1129, 1203, 2316, 3292, 3360 ou 3743 de SEQ ID NO:62, detecção de uma deleção no gene FAD3-1C de SEQ ID NO:62, ou detecção de pelo menos um único polimorfismo de nucleotídeo em uma sequência promotora de FAD3-1C de soja correspondendo a uma guanina no nucleotídeo 334, uma citosina no nucleotídeo 364, uma timina no nucleotídeo 385, uma adenina no nucleotídeo 387, uma citosina no nucleotídeo 393, uma guanina no nucleotídeo 729 e uma citosina no nucleotídeo 747 de SEQ ID NO:63.

45. Método de acordo com a reivindicação 41, em que a referida técnica de análise de DNA compreende a detecção de um único polimorfismo de nucleotídeo no referido gene de FAD3-1 B de soja compreendendo uma substituição de um resíduo de timina para um resíduo de citosina em uma posição na sequência de gene de FAD3-1 B correspondendo ao nucleotídeo 2021 de SEQ ID NO:61.

46. Método de acordo com a reivindicação 42, em que a referida técnica de análise de DNA compreende a detecção de um único polimorfismo de nucleotídeo no referido gene de FAD3-1B de soja compreendendo uma substituição de um resíduo de timina para um resíduo de citosina em uma posição na sequência de gene de FAD3-1B correspondendo ao nucleotídeo 2021 de SEQ ID NO:61.

47. Método de acordo com a reivindicação 36, em que o referido transgene também compreende um transgene que confere tolerância ao herbicida.

48. Método de acordo com a reivindicação 40, em que o referido transgene também compreende um transgene que confere tolerância ao herbicida e em que a referida planta de soja F1 que é heterozigoto para o referido transgene é obtida na etapa (i) submetendo uma pluralidade de plantas F1 à seleção de herbicida para o referido transgene.

49. Método de acordo com a reivindicação 40, em que o referido

transgene também compreende um transgene que confere tolerância ao herbicida e em que uma pluralidade de plantas F2 enriquecidas para plantas de soja F2 que são homozigotos para o referido transgene é obtida na etapa (ii) submetendo a referida pluralidade de plantas F2 à seleção de herbicida para o referido transgene.

50. Método de acordo com a reivindicação 47, em que o referido herbicida é glifosato.

51. Método de acordo com a reivindicação 47, em que o referido transgene compreende um gene CP4 EPSPS.

52. Método de acordo com a reivindicação 36, a referida planta de soja é criada na etapa (a) por :

a) transformação de uma planta de soja ou célula de planta de soja compreendendo pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene FAD3 de soja endógena com pelo menos um transgene que diminui a expressão de tanto de um gene FAD2-1 de soja endógena quanto um FATB de soja endógena para obter uma planta de soja R0 com pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3 que seja heterozigoto para o referido transgene;

b) fertilização cruzada contínua da referida planta de progênie R0 de (i) para obter uma planta de soja R1 que é homozigoto para o referido transgene e homozigoto para pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3, desse modo obtendo uma planta de soja compreendendo o referido transgene, e pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene FAD3 de soja endógena.

53. Método de acordo com a reivindicação 52, em que o referido transgene também compreende seqüências que conferem uma característica de tolerância ao herbicida.

54. Método de acordo com a reivindicação 53, em que o referido herbicida é glifosato.

55. Método de acordo com a reivindicação 40, também compreendendo a etapa iii) de fertilização cruzada contínua da referida progênie F2 que é homozigoto para o referido transgene e homozigoto para

pelo menos uma mutação de perda-de-função em um gene de FAD3 de (ii) para obter uma planta de soja F3.

56. Método de acordo com a reivindicação 36, em que a referida percentagem do teor de ácido graxo de semente total em peso de ácido linolênico, ácidos graxos saturados e ácido oléico é determinada na etapa (c) por uma técnica de análise de lipídeo.

57. Método de acordo com a reivindicação 56, em que a referida técnica de análise de lipídeo compreende uma ou mais técnicas selecionadas do grupo consistindo em detecção de cromatografia de gás/ionização de chama, cromatografia de gás/espectroscopia de massa, detecção de cromatografia de camada fina/ionização de chama, cromatografia líquida/espectrometria de massa, cromatografia líquida/ionização por eletrovaporização - espectrometria de massa e cromatografia líquida/ionização por eletrovaporização - espectroscopia aleatória de massa.

58. Planta de soja produzida por um método como definido na reivindicação 36.

59. Parte de planta da planta de soja como definida na reivindicação 58.

60. Parte de planta de acordo com a reivindicação 59, em que a referida parte da planta é pólen, um óvulo, um meristema, uma folha, um caule, uma raiz, ou uma célula.

61. Planta de soja de progênie da planta de soja como definida na reivindicação 58.

62. Semente da planta de soja produzida por um método como definida na reivindicação 36, a referida semente tendo uma composição de ácido graxo compreendendo um teor de ácido linolênico menor do que cerca de 6% de ácidos graxos de semente totais em peso, um teor de ácido graxo saturado menor do que cerca de 8% em peso e um teor de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso.

63. Semente da planta de soja produzida por um método como definido na reivindicação 39, a referida semente tendo uma composição de

ácido graxo compreendendo um teor de ácido linolênico menor do que cerca de 3% de ácidos graxos de semente totais em peso, um teor de ácido graxo saturado menor do que cerca de 8% em peso e um teor de ácido oléico de cerca de 55% a cerca de 80% de ácidos graxos de semente totais em peso.

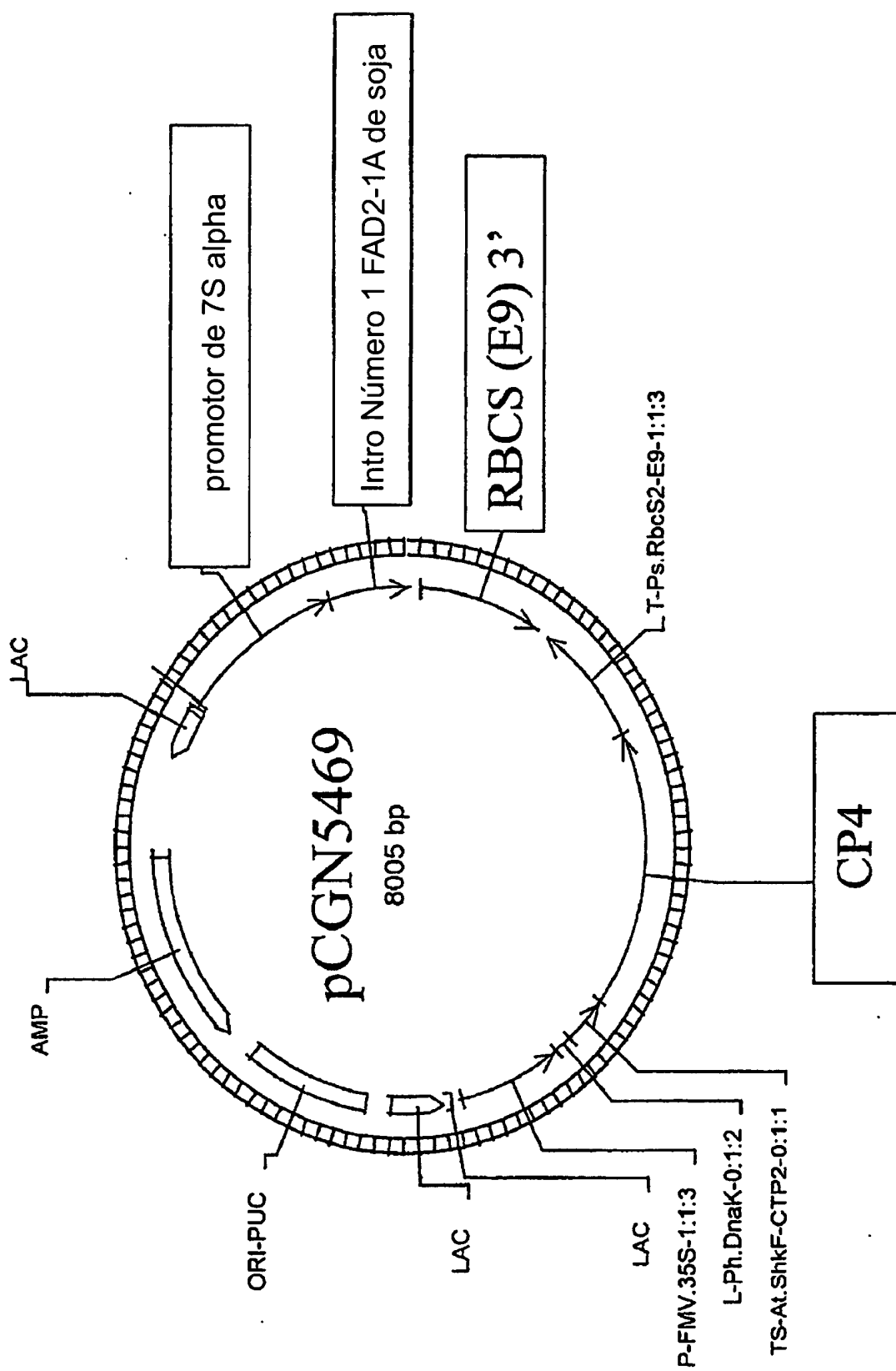


Fig. 1

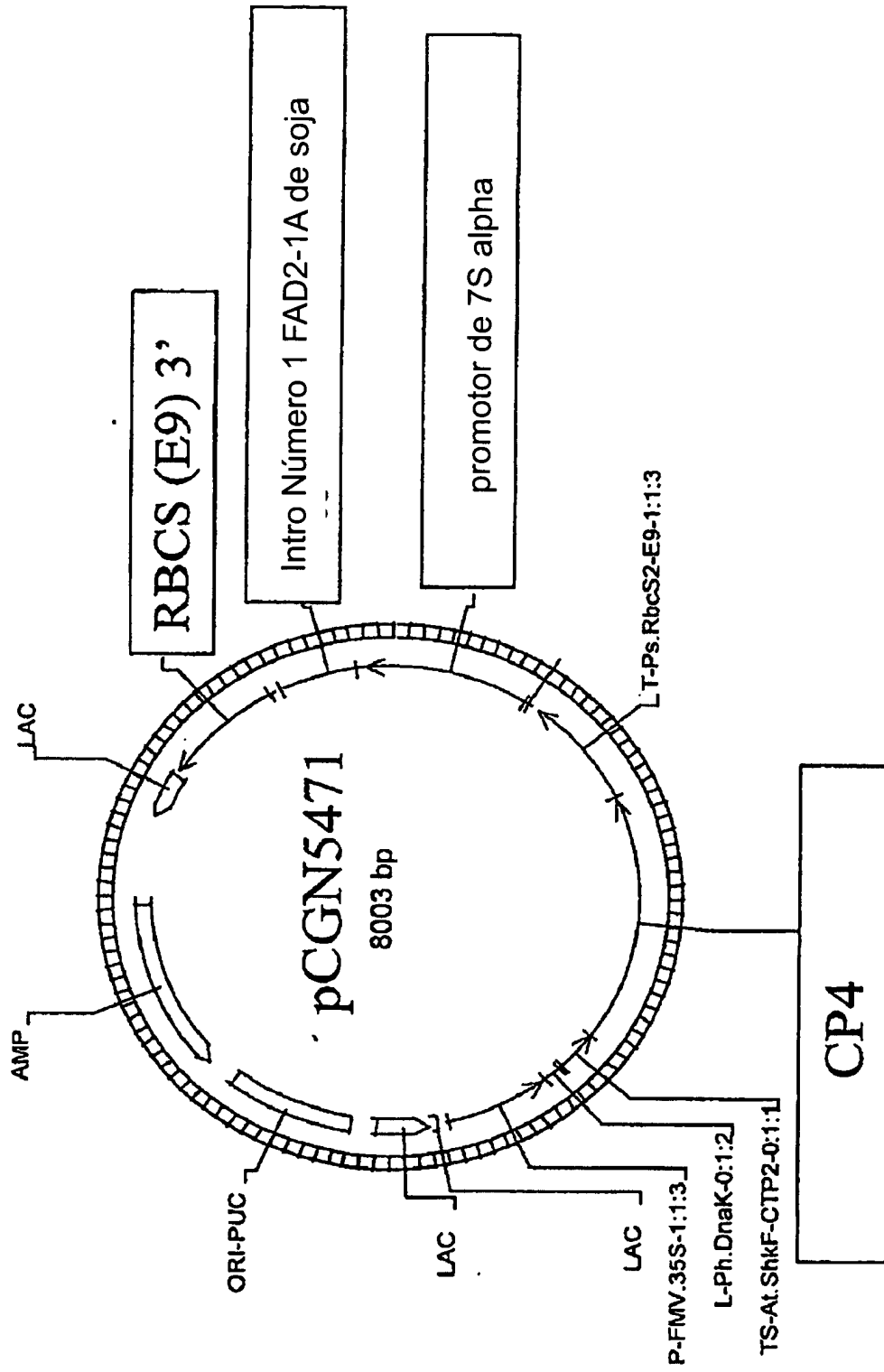


Fig. 2

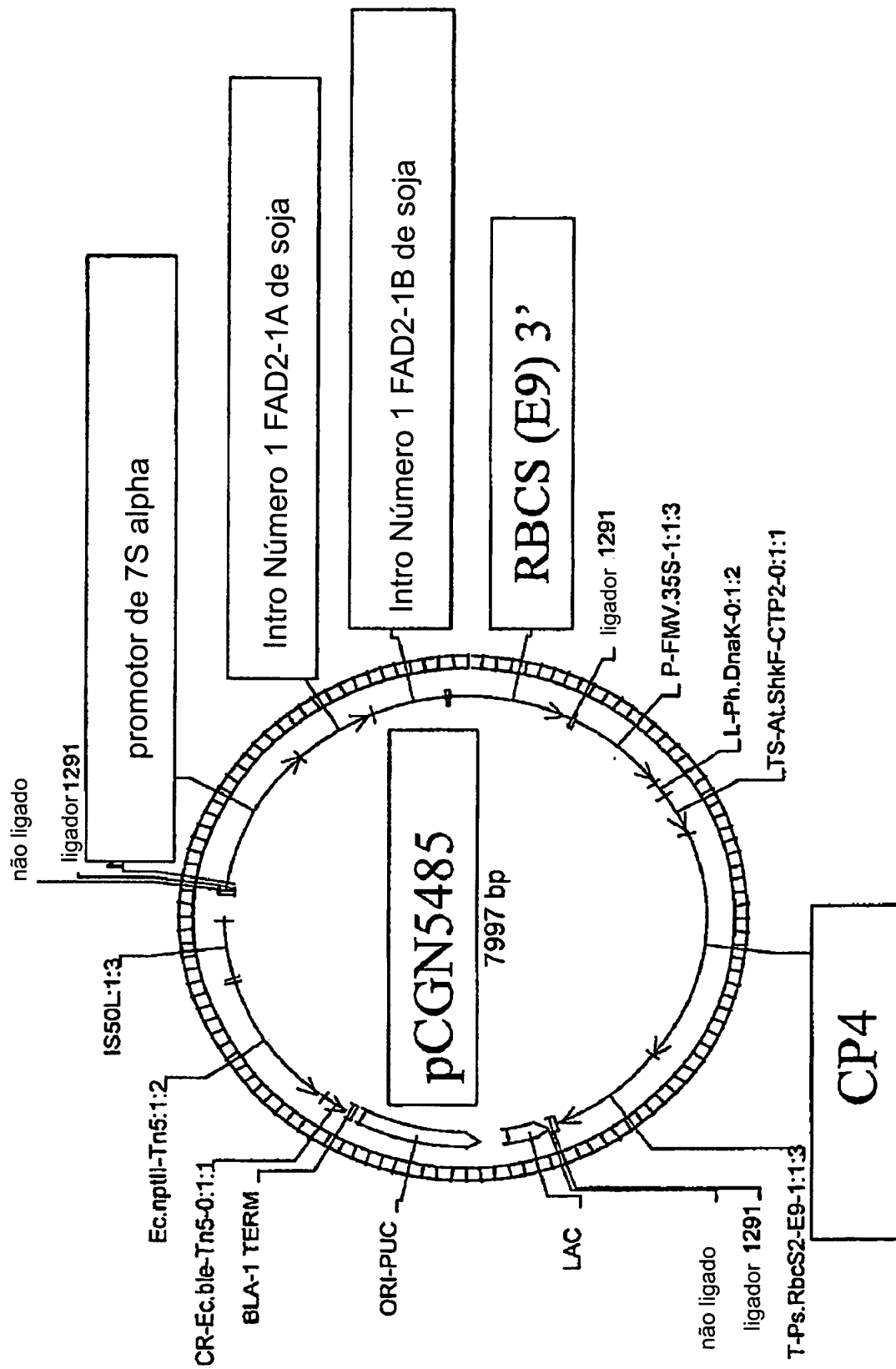


Fig. 3

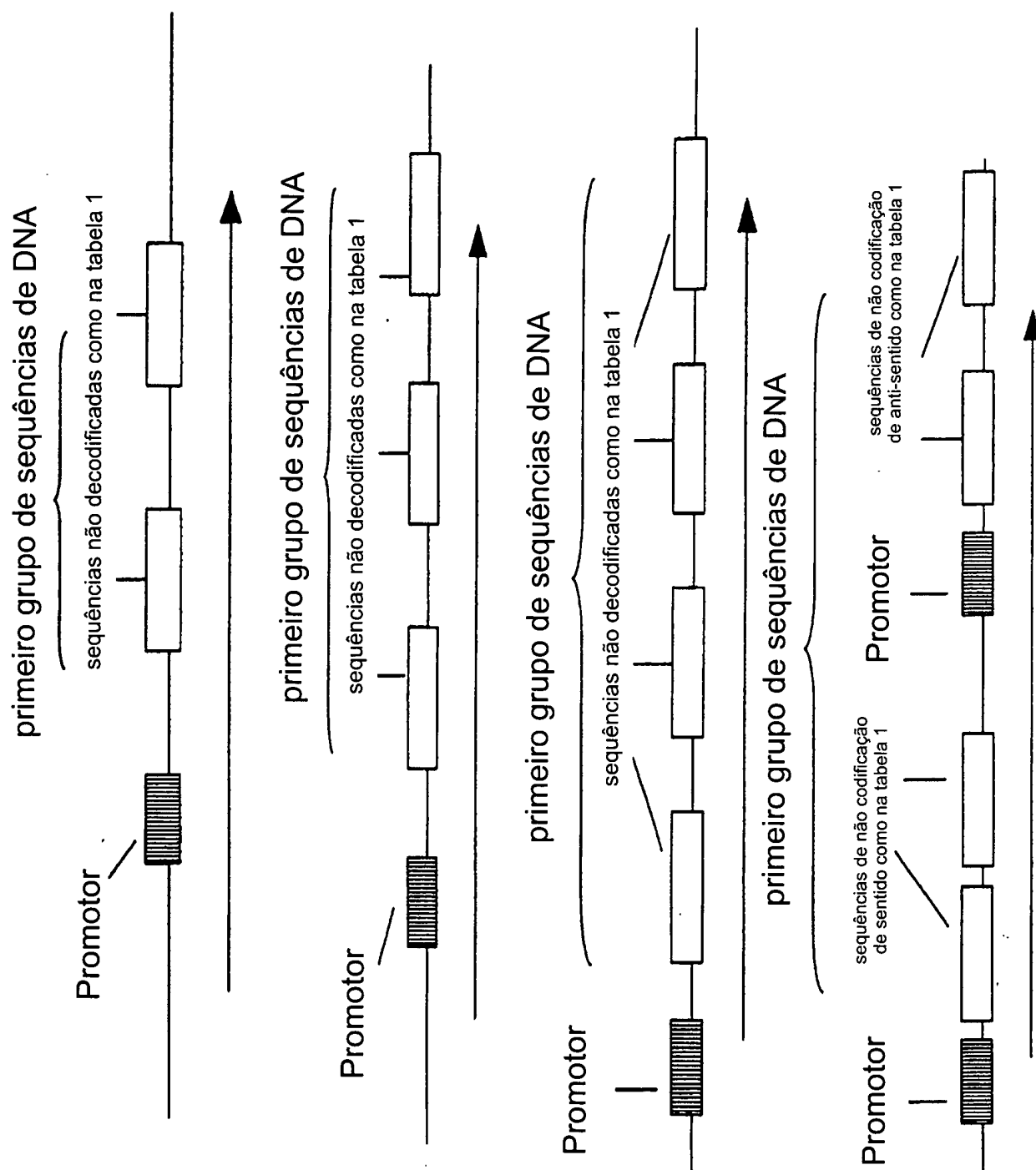


Fig. 4

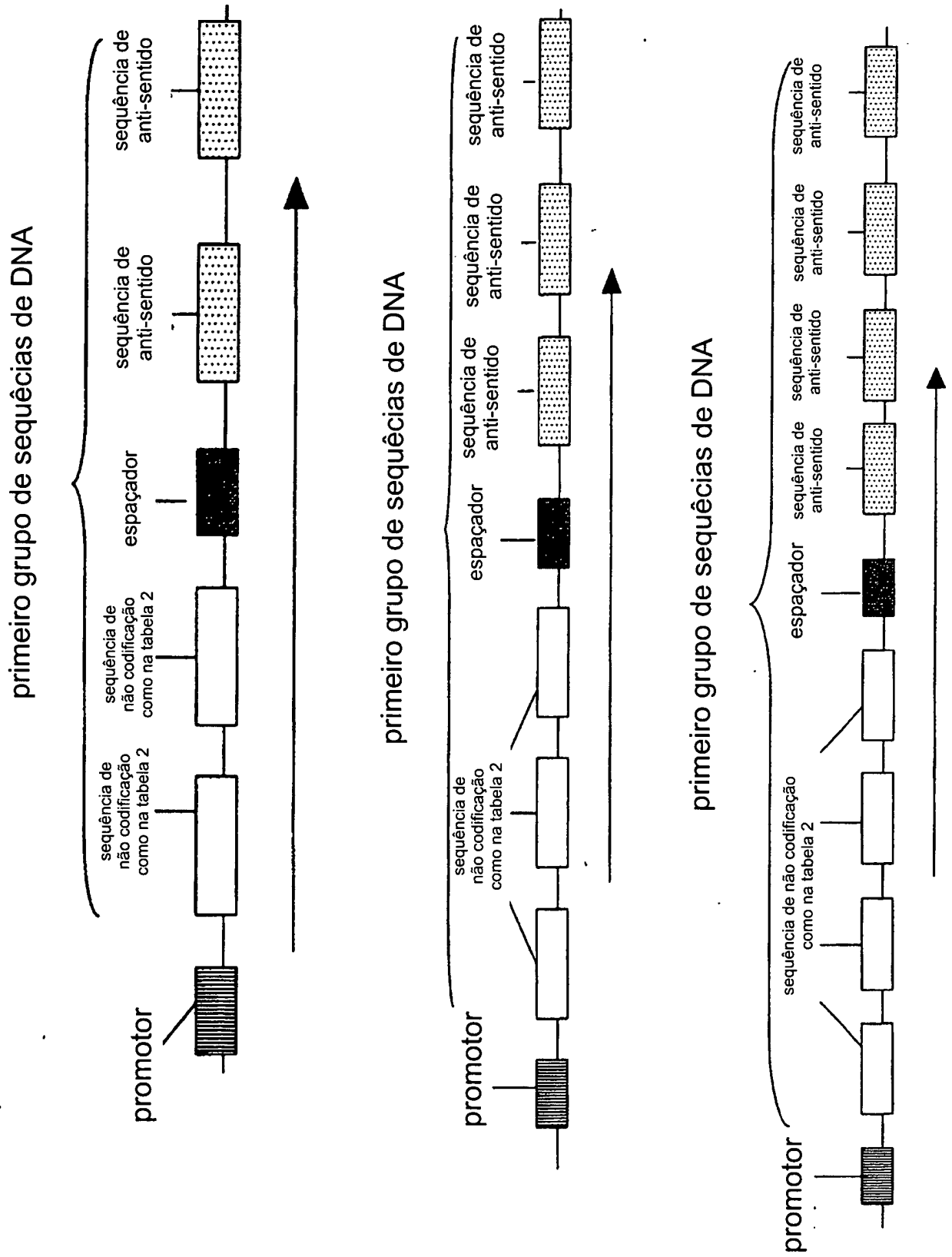


Fig. 5

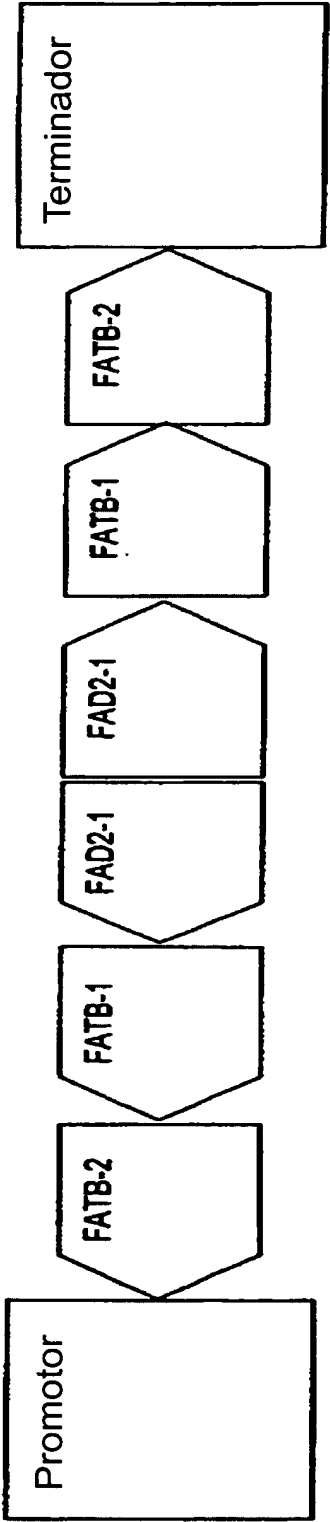
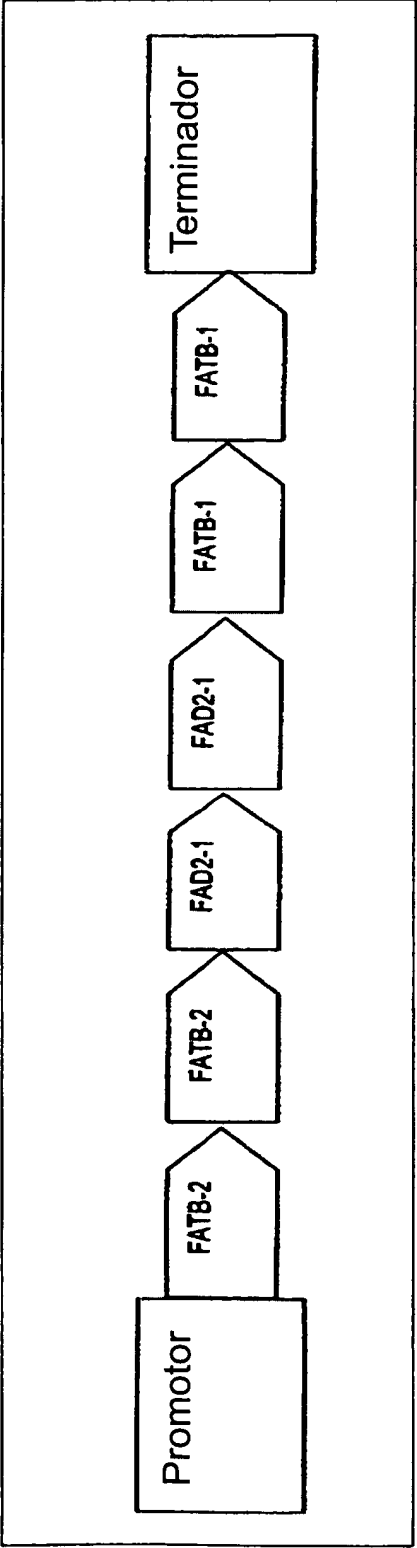


Fig. 6

P2008748-9

RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÕES DE ÓLEO E SEMENTE DE SOJA E MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DAS MESMAS**".

A presente invenção refere-se a métodos para obter plantas de soja que produzem semente com baixos níveis de ácido linolênico e níveis oléicos moderadamente aumentados. A invenção também refere-se a métodos para produzir semente com baixos níveis de ácido linolênico, níveis oléicos moderadamente aumentados e baixos níveis de ácido graxo saturado. Estes métodos vinculam a combinação de transgenes que fornecem níveis moderados de ácido oléico com idioplasma de soja que contém mutações em genes de soja que conferem baixos fenótipos de ácido linolênico. Estes métodos também vinculam a combinação de transgenes que fornecem tanto moderados níveis de ácido oléico quanto baixos níveis de gordura saturada com idioplasma de soja que contém mutações em genes de soja que conferem baixos fenótipos de ácido linolênico. A invenção também refere-se a plantas de soja e sementes produzidas por estes métodos são também descritas.