

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

(21) **PI0616848-5 A2**

(22) Data de Depósito: 02/10/2006
(43) Data da Publicação: 05/07/2011
(RPI 2113)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/82 2006.01

(54) Título: **SEMENTE DE PLANTA TRANSGÊNICA
COM MAIOR TEOR DE LISINA**

(30) Prioridade Unionista: 03/10/2005 US 60/723,178

(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC

(72) Inventor(es): Michael H. Luethy, Shihshieh Huang, Thomas
M. Malvar

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2006038289 de 02/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/041419 de 12/04/2007

(57) Resumo: SEMENTE DE PLANTA TRANSGÊNICA COM MAIOR TEOR DE USINA. A presente invenção refere-se a plantas transgênicas que possuem um novo constructo de DNA exógena que expressa uma ácido dihidrodipicolínico sintase e uma molécula de supressão gênica para a usina cetoglutarato redutase, cuja atividade resulta em um maior teor de usina em uma semente de planta.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**SEMENTE DE PLANTA TRANSGÊNICA COM MAIOR TEOR DE LISINA**".

REIVINDICAÇÃO PRIORITÁRIA

Este pedido de patente reivindica a prioridade do Pedido de Patente Provisório U.S. Nº de Ser. 60/723.178, depositado em 3 de outubro de 2005, cujo pedido é incorporado aqui como referência em sua totalidade.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

1. Campo da Invenção

São descritos aqui os constructos de DNA úteis para a produção de plantas transgênicas com partes possuindo maior teor de lisina e métodos de utilização de tais constructos de DNA para a produção de plantas e sementes transgênicas, materiais coletados das plantas e farinha grossa e produtos alimentícios preparados partindo dos mesmos. Tais constructos de DNA são úteis para a produção de plantas transgênicas com maior benefício nutricional através do maior acúmulo de lisina na semente. São também descritas as moléculas de polinucleotídeos e os métodos úteis para a produção de plantas transgênicas com maior teor de lisina em suas sementes.

2. Descrição da técnica Relacionada

Zea mays, comumente conhecido como milho ou milho, é um grão amplamente utilizado como alimentação para animais e alimento para seres humanos. O grão, aqui referido como um grão ou uma semente, é uma fonte de proteína, amido e óleo para muitos animais inferiores incluindo suínos, gado de corte e de leite, peixes e aves. Em alguns países, tal como o México, mais de 70% do milho colhido é utilizado para consumo humano e o milho e os produtos derivados do milho tais como angu de milho e tortilhas são elementos principais da dieta. No grão, o volume da composição de aminoácidos é determinada pela quantidade e o tipo de aminoácidos contidos nos polipeptídeos. Apenas uma parte relativamente pequena, até 10%, dos aminoácidos disponíveis no grão existe na forma de grupos de aminoácidos livres; o resto está contido em várias proteínas. No milho, a maior parte dos polipeptídeos encontrados no grão são proteínas de armazenamento da semente ou zeínas. Estas proteínas de armazenamento da semente são sinte-

tizadas à medida que o grão se desenvolve e são utilizadas como uma fonte de energia à medida que o grão germina e começa a crescer. As proteínas de armazenamento da semente, entretanto, contêm pouca ou nenhuma lisina. Dos dez aminoácidos considerados essenciais em um produto alimentício de grãos misturados (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina ou cisteína, fenilalanina ou tirosina, treonina, triptofano e valina), não está ausente no milho particularmente apenas a lisina, mas também a treonina e a metionina. A ausência destes aminoácidos essenciais, especialmente a lisina, requer que o milho para alimentos seja suplementado com estes nutrientes, freqüentemente fornecidos através da adição de farinha de soja ou lisina sintética. Seria benéfico para a técnica aumentar o nível de lisina na semente de milho como um meio de tornar a semente mais nutritiva como um alimento ou grão alimentício. O benefício adicional é realizado se o grão requerer pouca ou nenhuma suplementação de lisina adicional.

Na nutrição humana, os pobres tendem a consumir dietas contêm relativamente altas quantidades de alimentos com amido baratos e relativamente baixos teores de proteínas de qualidade. Kwashiorkor é uma forma de subnutrição causada pela ingestão inadequada de proteínas de qualidade na presença de ingestão de energia satisfatória a boa (calorias totais). Os sintomas iniciais são muito gerais e incluem fadiga, irritabilidade e letargia. Uma vez que a deficiência de proteínas continua, ocorrem falha no crescimento, perda de massa muscular, inchaço generalizado (edema) e imunidade diminuída. É comum uma barriga protuberante grande. Estados de saúde da pele (tais como dermatite, alterações na pigmentação, diminuição de pelos e vitiligo) são observados freqüentemente. Choque e coma precedem a morte. Uma estimativa do governo sugere que tanto quanto 50% das pessoas idosas em asilos nos EUA sofrem de subnutrição de proteína-caloria. Assim, os produtos de milho com maior qualidade de proteínas devido a níveis maiores de lisina melhorariam não apenas a qualidade nutricional da dieta, mas o nível geral global da saúde.

Uma abordagem de biologia molecular de plantas para aumentar os níveis de lisina envolve a identificação e a introdução de genes no milho

para afetar os níveis de lisina no grão sem afetar negativamente as propriedades agronômicas. A lisina é derivada do aspartato, cujo metabolismo está interconectado com vias que envolvem a treonina, a metionina e a isoleucina. A própria lisina serve como um produto final para a modificação e para a
5 regulação de enzimas na via para sua própria produção. As enzimas chaves envolvidas no metabolismo da lisina são a aspartato quinase (AK) e a ácido dihidrodipicolínico sintase (DHDPS), enquanto que a lisina-cetoglutarato re-
10 dutase (LKR, uma enzima bifuncional também conhecida como sacaropina desidrogenase, SDH) parece desempenhar uma função principal no catabo-
lismo da lisina. AK e DHDPS são respostas reguladas pela lisina; à medida que os níveis de lisina aumentam, o aminoácido regula para menos a atividade destas enzimas.

Assim, com a finalidade de aumentar os níveis de lisina, seria benéfico ter uma versão insensível ao "feedback" de AK ou DHDPS. As vari-
15 ações insensíveis à lisina de um gene AK bacteriano foram descritas assim como inúmeras variedades de plantas (vide Falco e outros, Patente U.S. Nº 5.773.691, incorporada aqui como referência). As formas insensíveis à lisina de AK foram identificadas partindo da cevada, do milho e do tabaco. Foi
20 mostrado que um gene DHDPS bacteriano, isolado de *E. coli*, é pelo menos 20 vezes menos sensível aos aumentos nos níveis de lisina (Glassman e outros, Patente U.S. Nº 5.258.300; Galili e outros, Patente U.S. Nº 5.367.110).

Falco e outros (Patentes U.S. Nºs 5.773.691 e 6.459.019, Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2003/0056242) e Dizigan e outros (Pu-
25 blicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2005/0132437), cada uma das quais é incorporada aqui como referência em sua totalidade, descrevem o isolamento e o uso de aspartato quinase insensível ao "feedback" de lisina (AK, o gene conhecido como *lysC*) de *E. coli*, DHDPS de *E. coli* e DHDPS de *Corynebacterium* (conhecido aqui como *CORgl.dapA*) para gerar plantas de se-
30 mente de colza, tabaco, milho e soja transgênicas com maiores níveis de lisina na semente.

A presente invenção fornece constructos de DNA que quando

expressas em células vegetais fornecem um maior componente nutricional de um produto vegetal, em particular, maior teor de lisina em uma semente de planta.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

5 São fornecidas aqui constructos de DNA que quando operacionais no genoma de uma planta transgênica conferem maiores níveis de lisina na semente da planta. As sementes com maior teor de lisina colhidas são úteis para a produção de alimento e de produtos alimentícios, tais como farinha de milho (também conhecida como "masa harina" (mistura culinária de
10 farinha)), farinha grossa de milho e produtos farináceos que requerem pouca ou nenhuma suplementação de lisina. Preferencialmente, a planta e a semente transgênicas são uma planta e uma semente de planta de cultivo, preferencialmente uma planta e uma semente de monocotiledônea e mais preferencialmente, uma planta e uma semente de milho.

15 A invenção fornece plantas e sementes transgênicas que compreendem os constructos de DNA e possuem maiores níveis de lisina na semente. Os constructos de DNA da presente invenção compreendem uma molécula que quando expressa nas células do milho inibe a produção de um polipeptídeo de degradação de lisina e uma molécula que quando expressa
20 nas células do milho fornece a produção de um polipeptídeo da ácido dihidrodipicolínico sintase insensível à lisina ou uma aspartato quinase insensível à lisina.

O grão colhido, mesmo quando não viável e, portanto, não pode ser utilizado como semente, oferece, contudo, os maiores níveis de lisina e
25 uma maior qualidade de proteína através desta invenção. Tal grão colhido é capaz de ser processado da mesma maneira que o grão convencional. Conseqüentemente, em uma outra modalidade, a invenção fornece um produto para alimentação animal com alto teor de lisina através do cultivo de uma planta transgênica da invenção e da colheita da semente com alto teor de
30 lisina ou através do processamento de uma semente da invenção ou de uma parte da mesma. Ainda em uma outra modalidade, a invenção fornece uma farinha ou um produto farináceo preparado através do cultivo de uma planta

transgênica da invenção e através da colheita da semente contendo alto teor de lisina ou através do processamento de uma semente da invenção ou de uma parte da mesma.

Em uma modalidade da invenção, um constructo de DNA compreende novas composições de polinucleotídeos que são melhoradas em relação à expressão em células vegetais, especialmente em células de milho. Um dos novos polinucleotídeos (SEQ ID NO: 5) que codifica um polipeptídeo da ácido dihidrodipicolínico sintase e um outro novo polinucleotídeo (SEQ ID NO: 9) que é homólogo e complementar a uma parte de uma sequência codificadora do polinucleotídeo da lisina cetoglutarato redutase. um constructo de DNA quando expressa em uma célula vegetal, especialmente uma célula vegetal de milho e preferencialmente uma célula de semente de milho causa um aumento na lisina na semente de milho. um constructo de DNA compreende polinucleotídeos, por exemplo, uma sequência tal como a SEQ ID NO: 1 que codifica uma ácido dihidrodipicolínico sintase insensível à lisina e uma sequência tal como a SEQ ID NO: 2 que codifica uma lisina cetoglutarato redutase que é utilizada como um molde para o planejamento de RNAs inibidores ou uma sequência tal como a SEQ ID NO: 3 que codifica uma aspartato quinase. O constructo de DNA compreende preferencialmente uma molécula promotora que é melhorada para direcionar a transcrição de um polinucleotídeo ligado de forma operacional em uma semente de milho. Adicionalmente, uma nova molécula de DNA (SEQ ID NO: 10) que compreende uma molécula de supressão gênica com um alvo do gene da lisina cetoglutarato redutase em que a molécula de supressão gênica está inserida dentro de um íntron do constructo de DNA.

Em uma outra modalidade, a invenção fornece um método de produção de uma semente de milho com alto teor de lisina através do cruzamento de parentais intracruzados para fornecer uma semente híbrida, em que cada parental contém um ou mais cassetes de expressão em planta dos constructos de DNA da presente invenção em seu genoma e os cassetes de expressão são diferentes um do outro em cada parental e nenhum parental contém todos os três e através da colheita da semente que possui um teor

de lisina maior que qualquer um dos parentais.

Em uma outra modalidade, a invenção fornece um método de produção de um produto para alimentação de seres humanos ou de um produto alimentício para animais com alto teor de lisina que compreende a etapa de processamento de uma semente ou de uma parte da mesma proveniente de uma planta transgênica que possui um genoma compreendendo um constructo de DNA exógena ou uma coleção de constructos de acordo com a presente invenção. Adicionalmente, a invenção fornece um método de produção de um produto para alimentação de seres humanos ou de um produto alimentício para animais com alto teor de lisina que compreende as etapas de cultivo de uma planta transgênica para a produção de semente, a semente possuindo um genoma que compreende um constructo de DNA exógena da presente invenção e de colheita da semente.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Mapa de plasmídeo que ilustra pMON66649
 Figura 2. Mapa de plasmídeo que ilustra pMON80003
 Figura 3. Mapa de plasmídeo que ilustra pMON79465
 Figura 4. Mapa de plasmídeo que ilustra pMON93092
 Figura 5 Mapa de plasmídeo que ilustra pMON93093
 Figura 6. Mapa de plasmídeo que ilustra pMON80378
 Figura 7. Teor de lisina livre dos grãos R2 provenientes dos eventos que compreendem pMON93092.

Figura 8. Teor de lisina livre de grãos R2 provenientes dos eventos que compreendem pMON93093.

25 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Uma planta ou uma semente transgênica que exibe uma característica desejada, por exemplo, maior teor de lisina da presente invenção, compreende um DNA exógeno particular inserido dentro do genoma da planta transgênica que confere a característica desejada. A característica é expressa na forma de uma alteração que pode ser medida partindo da característica que ocorre naturalmente em uma planta de controle, por exemplo, um planta ou uma semente com substancialmente o mesmo genótipo que não

possui tal DNA exógeno particular. Preferencialmente, a alteração é medida através da comparação da expressão da característica em uma planta ou em uma semente transgênica que possui o DNA exógeno particular associado com a característica desejada com a expressão da mesma característica em uma planta ou em uma semente de controle. "Milho com alto teor de lisina" é, portanto, uma planta de milho com maior teor de lisina em qualquer parte da planta, preferencialmente em uma semente, que também pode ser referida aqui como um grão ou no agregado como grão. A presente invenção fornece constructos de DNA e sementes que contêm pelo menos um dos cassetes de expressão vegetal dos constructos de DNA das presentes invenções em seu genoma, em que a semente possui um maior teor de lisina que as sementes que não contêm o constructo.

O maior teor de lisina pode ser exibido pela planta através do acúmulo de maiores quantidades do aminoácido no grão e pode ser medido através de qualquer método adequado, tal como espectrofotometria de massa ou cromatografia líquida de alto desempenho de um tecido extraído de forma apropriada. Um grão de milho transgênico da presente invenção com maior teor de lisina é especialmente útil como um alimento ou um produto alimentício, uma farinha ou um produto farináceo, uma fonte de produtos protéicos de milho purificados ou uma fonte de outros produtos processados partindo do grão que contêm um maior teor de lisina que os grãos não transgênicos de uma variedade similar.

O grão de milho com o um nível de aproximadamente 4000 partes por milhão (ppm) de lisina total possui uma quantidade suficiente de lisina de forma que o produto alimentício ou para alimentação de gado feito partindo do grão não requer suplementação partindo de fontes de lisina adicionais. O milho com alto teor de lisina da presente invenção atinge este nível de produção e de acúmulo de lisina em um grão de milho. A presente invenção é uma melhora substancial em relação aos métodos e às composições descritos previamente para o aumento de lisina em um grão de milho (por exemplo, Patente U.S. Nº 5.773.691).

Os esforços para aumentar os níveis de aminoácidos em plantas

transgênicas incluem a expressão de moléculas de DNA recombinantes que codificam proteínas em uma via de síntese de aminoácidos em níveis maiores que os genes nativos. Um método para a produção de maiores níveis de lisina no milho é através da expressão de uma ácido dihidrodipicolínico sintase (DHDPS) bacteriana que é descrita nas Patentes U.S. Nºs 5.288.300, 6.459.019 e na Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2003/0056242 A1 e da supressão de LKR endógena (Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2005/0193444), das quais cada uma é incorporada aqui como referência em sua totalidade.

10 Qualquer uma das plantas ou das partes das mesmas da presente invenção pode ser processada para a produção de uma preparação alimentícia, de farinha, de farinha grossa, de proteína ou de óleo. Uma parte da planta particularmente preferida para esta finalidade é a semente. Em uma modalidade preferida a preparação alimentícia, de farinha, de farinha grossa, de proteína ou de óleo é planejada para uso na alimentação de ani-
15 mais de fazenda (gado). Os métodos para a produção de preparações alimentícias, de farinha, de farinha grossa, de proteína e de óleo são conhecidos na técnica, por exemplo, Patentes U.S. Nºs 4.957.748; 5.100.679; 5.219.596; 5.936.069; 6.005.076; 6.146.669; e 6.156.227, incorporadas aqui
20 como referência em sua totalidade. Em uma modalidade preferida, a preparação de proteína é uma preparação de alto teor de proteína, tal como um concentrado ou um isolado. A preparação com alto teor de proteína possui preferencialmente um teor de proteína maior que 5% p/v, mais preferencialmente 10% p/v e ainda mais preferencialmente 15% p/v.

25 Em uma modalidade adicional, a farinha grossa da presente invenção pode ser mesclada com outras farinhas grossas. Em uma modalidade preferida, a farinha grossa produzida partindo de plantas ou de sementes da presente invenção ou geradas através de um método da presente invenção constitui mais que aproximadamente 0,5%, aproximadamente 1%, apro-
30 ximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 25%, aproximadamente 50%, aproximadamente 75% ou aproximadamente 90% em volume ou em peso do componente de farinha grossa de qualquer produto. Em

uma outra modalidade, a preparação de farinha grossa pode ser mesclada e pode constituir mais que aproximadamente 10%, aproximadamente 25%, aproximadamente 35%, aproximadamente 50% ou aproximadamente 75% da mescla em volume. A presente invenção fornece ainda um método de
5 melhoramento do crescimento de um ser humano ou de um animal inferior que compreende a alimentação do ser humano ou do animal inferior com uma dieta em que pelo menos uma parte da dieta é um milho com alto teor de lisina que compreende um ou mais dos cassetes de expressão vegetal da presente invenção. Como utilizado aqui, é pretendido que o termo "animal
10 inferior" abranja a alimentação de aves e de peixes assim como de mamíferos.

Constructos de DNA Recombinante

A presente invenção fornece constructos de DNA que compreendem polinucleotídeos ligados de forma operacional que são eficientes para
15 para conferir maior teor de lisina em grãos de milho. O termo "constructo de DNA" inclui, mas não está limitado às moléculas de polinucleotídeos que direcionam a transcrição de moléculas de polinucleotídeos ligadas em uma célula vegetal. Pelo menos uma parte de um constructo de DNA da presente invenção é utilizada em um método para a transformação de uma célula ve-
20 getal, que é, a parte que está inserida de forma estável no genoma da célula. A parte é responsável pelo fenótipo de alto teor de lisina nos grãos de milho ou na farinha grossa produzida partindo de tais grãos e é um aspecto da presente invenção. Um depósito pela Monsanto Technology LLC dos constructos de DNA pMON93092 e pMON09093 foi feito sob o Tratado de
25 Budapeste junto a American Type Culture Collection (ATCC) como os números de acesso PTA-6733 e PTA-6734, respectivamente. Estes depósitos constituem uma parte da descrição desta invenção embora seja acreditado que as seqüências fornecidas aqui na descrição escrita sejam acuradas, a seqüência de polinucleotídeo das moléculas de DNA que compreendem e-
30 lementos reguladores, moléculas codificadoras e moléculas não codificadoras pode ser determinada partindo do depósito se necessário e utilizada para corrigir as seqüências descritas aqui.

As moléculas de polinucleotídeos são ligadas às constructos de DNA recombinantes utilizando métodos conhecidos pelos peritos comuns na técnica. Um exemplo de uma tecnologia útil para o desenvolvimento dos constructos de DNA é a tecnologia de clonagem GATEWAY® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia) que utiliza a reação de clonagem com a recombinase LR específica ao sítio do sistema Integrase/*att* do bacteriófago lambda para o constructo de vetores ao invés de endonucleases de restrição e ligases. O GATEWAY® Cloning Technology Instruction Manual fornecido pela Invitrogen fornece ainda diretrizes resumidas para a clonagem de rotina de qualquer polinucleotídeo desejado em um vetor que compreende elementos de expressão vegetal operacionais. Métodos adicionais são descritos em *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edição Volumes 1, 2 e 3. J.F. Sambrook, D.W. Russell e N. Irwin, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000 (referido aqui como Sambrook e outros).

Como utilizado aqui "DNA exógeno ou DNA isolado" refere-se à molécula de DNA que não é normalmente encontrada no genoma de uma célula hospedeira ou a um DNA não normalmente encontrado no genoma hospedeiro em um contexto idêntico ou quaisquer duas seqüências adjacentes uma a cada outra que não estão normalmente ou naturalmente adjacentes uma a cada outra. O DNA exógeno pode incluir uma molécula de polinucleotídeo de DNA ou de RNA nativa ao genoma hospedeiro ou pode compreender o polinucleotídeo nativo alterado através da adição ou da deleção de um ou mais polinucleotídeos ou modificações nos elementos reguladores dos polinucleotídeos associados ou outras seqüências de polinucleotídeos como discutido aqui. Em adição aos elementos reguladores, um DNA exógeno pode conter uma seqüência codificadora que codifica uma proteína ou um polipeptídeo ou uma seqüência não codificadora que produz um produto sem ser protéico, tal como uma molécula de RNA que afeta a transcrição ou a tradução de uma outra seqüência de DNA. Um constructo de DNA da presente invenção que compreende uma seqüência codificadora e uma seqüência não codificadora.

Os constructos de DNA exógeno utilizados para a transformação

de células vegetais compreenderão a seqüência codificadora de interesse e geralmente outros elementos reguladores como discutido aqui tais como, mas não limitados a promotores, íntrons, regiões não traduzidas a 5' e a 3', seqüências líderes, seqüências de localização e de trânsito e intensificadores, a ligação operacional destes elementos reguladores para a expressão de um RNA em uma célula vegetal sendo preferida aqui como um cassete de expressão vegetal heterólogo. Os constructos de DNA que estão listados na Tabela 1 ilustram a ligação de elementos reguladores em cassetes de expressão que expressam seqüências codificadoras e seqüências não codificadoras e os níveis médios de lisina medidos na semente de milho transgênico compreendendo cada constructo. Uma molécula de DNA promotora de um constructo de DNA exógeno da presente invenção é exemplificada por um promotor intensificado na semente ou específico à semente que inclui, por exemplo, aqueles para uso em uma planta de cultivo monocotiledônea, tal como, um promotor L3 de milho (Patente U.S. Nº 6.433.252 ou homólogos do mesmo, incorporada aqui como referência ao P-Zm.L3 na presente invenção), um promotor B32 de milho (SEQ ID NO: 4 ou homólogos do mesmo, referido aqui como P-Zm.B32), um promotor da gama coxina do milho (Patente U.S. Nº 6.635.806 incorporada aqui como referência ou homólogos do mesmo, referido ao P-Zm.Gcx) ou qualquer um dos quais é utilizado em um constructo de DNA da presente invenção ou outros promotores conhecidos que são responsáveis pela maior transcrição em uma semente de milho são referidos aqui como P-Zm.semente. Os exemplos de promotores adicionais que funcionam nas sementes, incluem, mas não estão limitados aos promotores que controlam a expressão de proteínas de armazenamento de semente, tais como a glutelina do arroz e as proteínas pró-lamina de espécies de *Triticeae* e promotores que controlam a expressão de enzimas envolvidas na síntese de amido na semente, tais como, os promotores que controlam a expressão da ADP glicose amido glicosil transferase de monocotiledôneas. O promotor de semente selecionado está ligado de forma operacional a uma região codificadora de DHDPS (por exemplo, SEQ ID NO: 1, referida aqui como CORgl.dapA) ou uma região codificadora da aspartato

quinase (por exemplo, SEQ ID NO: 3). Os promotores intensificados na semente e específicos à semente adicionais são conhecidos na técnica e podem ser selecionados e testados em ligação operacional com as moléculas codificadoras e as moléculas não codificadoras de DNA da presente invenção através dos métodos descritos na presente invenção ou de métodos similares conhecidos pelos versados na técnica da biologia molecular de plantas. Um promotor intensificado na semente é expresso primariamente em toda ou em uma parte de uma semente, embora possa ser secundariamente expresso em outras células vegetais, tecidos ou órgãos da planta. Uma parte de uma semente inclui, mas não está limitada a um embrião, um endosperma, um revestimento de semente, um coleóptilo, um cotilédone, um hipocotilédone, uma calada de aleurona, um pericarpo ou um escutelo. As regiões reguladoras adicionais fornecidas nos constructos de DNA podem incluir, mas não estão limitadas a um íntron (I-), um sinal de trânsito (TS-), um líder não traduzido a 5' (L-), uma região de poliadenilação a 3' (T-) ou uma região anti-sentido não codificadora. Um cassete de expressão com marcador que pode ser selecionado ou quantificado também pode ser incluído para auxiliar na seleção ou na identificação de células e tecidos vegetais transformados. O constructo da presente invenção contém opcionalmente um cassete de expressão que fornece tolerância ao glifosato à planta de milho e pode ser utilizado como um marcador que pode ser selecionado. Como utilizado aqui "transgene" significa um DNA exógeno que é incorporado em um genoma hospedeiro ou que é capaz de se replicar de forma autônoma em uma célula hospedeira e que é capaz de causar a expressão de um ou mais produtos celulares. Os exemplos de transgenes fornecerão à célula hospedeira, às plantas regeneradas da mesma ou às partes de tais plantas, um novo fenótipo em relação à célula ou à planta não transformada correspondente, por exemplo, maior teor de lisina em um grão de milho. Os transgenes podem ser introduzidos diretamente em uma planta através de transformação genética e são preferencialmente estáveis e podem ser herdados de forma que podem ser herdados de um a planta de qualquer geração anterior que foi transformada com o DNA exógeno.

Como utilizado aqui, "gene" ou "seqüência codificadora" significa uma molécula de DNA partindo da qual uma molécula de RNA é transcrita. A molécula de DNA fornece uma região codificadora (CR-) para um mRNA que codifica um produto protéico ou um RNA que funciona como uma molécula de supressão gênica ou uma molécula de RNA estrutural tal como um tRNA, um rRNA, um snRNA ou outro RNA. Como utilizado aqui "expressão" se refere à combinação de processos intracelulares, incluindo a transcrição e a tradução, através dos quais uma molécula de DNA, tal como um gene, produz um polipeptídeo ou uma molécula de RNA. Um exemplo de seqüência codificadora é um gene da dihidrodipicolinato sintase de *Corynebacterium* (DHDPS; Bonnassie e outros, 1990; Richaud e outros, 1986) útil para a produção de grãos de milho com maior teor de lisina. Uma planta de milho, transformada para conter e expressar um gene DHDPS de *Corynebacterium* ou qualquer outro gene que resulte em um maior teor de lisina no tecido do grão, é também referida como uma planta de milho com alto teor de lisina. A região codificadora da DHDPS de *Corynebacterium* da presente invenção é adicionalmente modificada para fornecer maior expressão em uma célula vegetal, preferencialmente em uma célula de monocotiledônea e mais preferencialmente em uma célula de milho. A região codificadora da DHDPS de *Corynebacterium* modificada utilizada na presente invenção é descrita como a SEQ ID NO: 5, referida aqui como CORgl.dapA.nno.

Como utilizado aqui "promotor" significa uma região da seqüência de DNA que inicia a transcrição do RNA partindo do DNA. Os promotores ficam localizados a montante do DNA que será transcrito e possuem regiões que atuam como sítios de ligação para a RNA polimerase e possuem regiões que atuam com outros fatores para promover a transcrição do RNA. Mais especificamente, os promotores basais nas plantas compreendem regiões canônicas associadas com o início da transcrição, tais como as caixas CAAT e TATA. Na presente invenção, as moléculas promotoras preferidas e as moléculas de UTR a 5' são responsáveis pela transcrição nas células ou nos tecidos da semente em uma taxa ou um nível maior que em outras células e tecidos da planta. As moléculas promotoras podem ser selecionadas

das conhecidas na técnica, por exemplo, os promotores são descritos na Patente U.S. Nº 6.437.217 (promotor RS81 do milho), na Patente U.S. Nº 5.641.876 (promotor da actina do arroz), na Patente U.S. Nº 6.426.446 (promotor RS324 do milho), na Patente U.S. Nº 6.429.362 (promotor PR-1
5 do milho), na Patente U.S. Nº 6.232.526 (promotor A3 do milho), na Patente U.S. Nº 6.177.611 (promotores constitutivos do milho), nas Patentes U.S. Nºs 5.322.938, 5.352.605, 5.359.142 e 5.530.196 (promotor 35S), na Patente U.S. Nº 6.433.252 (promotor da oleosina L3 do milho, P-Zm.L3), na Patente U.S. Nº 6.429.357 (promotor da actina 2 do arroz assim como um íntron da
10 actina 2 do arroz), na Patente U.S. Nº 5.837.848 (promotor específico à raiz), na Patente U.S. Nº 6.294.714 (promotores que podem ser induzidos pela luz), na Patente U.S. Nº 6.140.078 (promotores que podem ser induzidos por sais), na Patente U.S. Nº 6.252.138 (promotores que podem ser induzidos por agentes patogênicos), na Patente U.S. Nº 6.175.060 (promotores que
15 podem ser induzidos pela deficiência de fósforo), na Patente U.S. Nº 6.635.806 (promotor da gama-coixina, P-Cl.Gcx) e no Pedido de Patente U.S. Nº de Série 09/757.089 (promotor da aldolase de cloroplasto de milho), das quais todas são incorporadas aqui como referência. Adicionalmente, podem ser construídas moléculas promotoras quiméricas que possuem ele-
20 mentos em cis derivados de fontes heterólogas que fornecem aumento adicional do perfil de expressão do promotor úteis na presente invenção. Por exemplo, foi mostrado que elementos promotores de vírus de plantas fornecem aumentos aos elementos promotores de plantas quando ligados de forma operacional (Patente U.S. Nº 6.660.911, incorporada aqui como refe-
25 rência em sua totalidade).

Os constructos de DNA para uso na transformação de plantas compreendem tipicamente ainda outros elementos reguladores em adição a um promotor, tais como, mas não limitados às regiões não traduzidas a 3' (contendo sítios de poliadenilação), aos peptídeos de trânsito ou de sinal
30 para o direcionamento de uma proteína para uma organela celular da planta, particularmente para um cloroplasto, um leucoplasto ou outra organela de plastídeo.

Um versado na técnica conhecerá vários íntrons, intensificadores, peptídeos de trânsito, seqüências de sinal de direcionamento, regiões não traduzidas a 5' e a 3' (UTRs) úteis no planejamento de vetores de expressão vegetal eficientes, tais como os descritos, por exemplo, na Publicação de Patente U.S. Nº 2003/01403641 (incorporada aqui como referência).

Uma UTR a 5' que funciona como uma seqüência líder de tradução é um elemento genético de DNA localizado entre a seqüência promotora de um gene e a seqüência codificadora. A seqüência líder de tradução está presente no mRNA completamente processado a montante da seqüência de início da tradução. A seqüência líder de tradução pode afetar o processamento do produto de transcrição primário no mRNA ou pode afetar a estabilidade ou a eficiência de tradução do mRNA. Os exemplos de seqüências líderes de tradução incluem líderes de proteína de choque térmico do milho e da petúnia (Patente U.S. Nº 5.362.865), líderes de proteína de revestimento de vírus vegetais, líderes da Rubisco vegetal, entre outros (Turner e Foster, 1995). As moléculas líderes associadas no contexto nativo com as moléculas promotoras descritas na presente invenção incluem, por exemplo, o líder B32 do milho (L-Zm.B32), o líder da actina 1 do arroz (L-Os.Act1), o líder da gama coixina (L-Ci.Gcx).

A região não traduzida a 3' (UTR a 3') ou a região de poliadenilação a 3' significa uma molécula de DNA ligada a e localizada a jusante de uma molécula de polinucleotídeo estrutural e inclui polinucleotídeos que fornecem um sinal de poliadenilação e outros sinais reguladores capazes de afetar a transcrição, o processamento do mRNA ou a expressão gênica. O sinal de poliadenilação funciona nas plantas para causar a adição de nucleotídeos poliadenilatos na extremidade a 3' do precursor do mRNA. A seqüência de poliadenilação pode ser derivada do gene natural, partindo de uma variedade de genes vegetais ou de genes de T-DNA de *Agrobacterium*. Os exemplos de regiões UTR a 3' são a região a 3' da nopalina sintase (nos 3'; Fraley e outros, 1983), hsp17 do trigo (T-Ta.Hsp17) e T-Ps.RbcS2:E9 (subunidade pequena da rubisco da ervilha), as descritas na WO0011200A2 e outras UTRs a 3' conhecidas na técnica podem ser testadas e utilizadas em

combinação com uma região codificadora de DHDPS ou de AK, referida aqui como T-3'UTR.

Os sinais de trânsito se referem de forma geral a moléculas peptídicas que quando ligadas a uma proteína de interesse direcionam a proteína para um tecido, uma célula, uma localização subcelular ou organela celular particular. Os exemplos incluem, mas não estão limitados a peptídeos de trânsito para cloroplastos, sinais de direcionamento nuclear e sinais vacuolares. O peptídeo de trânsito para plastídeos tem utilidade particular na presente invenção para direcionar a expressão da enzima DHDPS para os plastídeos em uma semente. Um peptídeo de trânsito para cloroplastos (CTP) pode ser engenheirado para ser fundido com o terminal N de proteínas que devem ser direcionadas para dentro do cloroplasto vegetal. Muitas proteínas localizadas no cloroplasto são expressas partindo de genes nucleares como precursores e são direcionadas para o cloroplasto por um CTP que é removido durante as etapas de importação. Os exemplos de proteínas de cloroplasto incluem a subunidade pequena da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase (RbcS2), a ferredoxina, a ferredoxina oxidoredutase, a proteína I e a proteína II do complexo de coleta de luz e a tiorredoxina F. Foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* que as proteínas sem ser de cloroplasto podem ser direcionadas para o cloroplasto através do uso de fusões de proteínas com um CTP e que um CTP é suficiente para direcionar uma proteína para o cloroplasto. A incorporação de um peptídeo de trânsito para cloroplasto adequado, tal como, o CTP de EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (Klee e outros, 1987) e foi mostrado que o CTP de EPSPS de *Petunia hybrida* (della-Cioppa e outros, 1986) direciona a proteína heteróloga para os cloroplastos em plantas transgênicas. O CTP de DapA de *Zea mays* (SEQ ID NO: 6, referido aqui como TS-Zm.DapA) da presente invenção tem a utilidade de fornecer direção do polipeptídeo de DHDPS ligado para dentro dos plastídeos da semente. Os versados na técnica reconhecerão que podem ser feitas vários constructos quiméricos que utilizam a funcionalidade de um CTP particular para a importação de um polipeptídeo de DHDPS heterólogo para dentro do plastídeo da célula vegetal. Para uma descrição do uso de um peptídeo de trânsito para

cloroplasto vide a Patente U.S. Nº 5.188.642, incorporada aqui como referência.

A Tabela 1 ilustra as combinações de promotores e outros elementos reguladores ligados de forma operacional às moléculas de supressão do gene LKR e às moléculas que codificam DHDPS e seu efeito resultante sobre os níveis de lisina nas plantas e nos grãos de milho. Um versado na técnica saberia que as moléculas de DNA exógeno possuindo função similar poderiam ser substituídas pelas ilustradas na Tabela 1 e testadas nos métodos descritos aqui ou em métodos relacionados que são úteis para a avaliação dos níveis de lisina nos tecidos vegetais, grãos ou produtos processados.

Os constructos de DNA da presente invenção podem conter opcionalmente uma molécula marcadora que pode ser selecionada ou que pode ser quantificada. São de importância particular as moléculas marcadoras que podem ser selecionadas que fornecem ainda uma característica agromônica valiosa, por exemplo, tolerância a herbicidas. Os herbicidas para os quais a tolerância da planta transgênica foi demonstrada e o método da presente invenção que podem ser aplicados, incluem, mas não estão limitados a: glifosato, glufosinato, sulfoniluréias, imidazolinonas, bromoxinil, dalapon, ciclohexanodiona, inibidores da protoporfirinogênio oxidase e herbicidas de isoxaflutol. As moléculas de polinucleotídeos que codificam proteínas envolvidas na tolerância a herbicidas são conhecidas na técnica e incluem, mas não estão limitadas a uma molécula de polinucleotídeo que codifica a 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPS, descrita nas Patentes U.S. Nºs 5.627.061; 5.633.435; 6.040.497. Padgett e outros, 1996; e Penaloza-Vazquez e outros, 1995; e *aroA* (Patente U.S. Nº 5.094.945) para tolerância ao glifosato; bromoxinil nitrilase (*Bxn*) para tolerância a Bromoxinil (Patente U.S. Nº 4.810.648); fitoeno dessaturase (*crtI*, Misawa e outros, 1993 e 1994); para tolerância a norflurazon, acetohidroxiácido sintase (AHAS, *aka* ALS, Sathasiivan e outros, 1990); e o gene *bar* para tolerância a glufosinato e a bialafos (DeBlock e outros, 1987).

A tolerância a herbicidas é um fenótipo desejável para plantas

de cultivo. Os constructos de DNA da presente invenção contêm preferencialmente um cassete de expressão que fornece tolerância ao glifosato na planta de milho transformada. O cassete de expressão permite adicionalmente a seleção de células de milho transformadas em um meio contendo

5 glifosato. O cassete de expressão contém preferencialmente um promotor que direciona a transcrição de um gene que codifica uma EPSPS resistente ao glifosato em todas as células da planta transformada. Em particular, o cassete de expressão tolerante ao glifosato da presente invenção compreende o promotor e o íntron da actina 1 do arroz (P-Os.Act1, I-Os.Act1, Pa-

10 tente U.S. Nº 5.641.876, incorporada aqui como referência) ligados de forma operacional a um polinucleotídeo que codifica um peptídeo de trânsito para cloroplasto e um polinucleotídeo que codifica uma EPSPS resistente ao glifosato isolada da cepa CP4 de *Agrobacterium* (referida aqui como aroA:CP4 EPSPS, Patente U.S. Nº 5.633.435, incorporada aqui como referência). A N-

15 fosfonometilglicina, também conhecida como glifosato, é um herbicida bem conhecido que possui atividade sobre um amplo espectro de espécies vegetais. O glifosato é o ingrediente ativo do herbicida Roundup® (Monsanto Co., St. Louis, MO), um herbicida seguro que possui, de forma desejável, uma meia-vida curta desejável no ambiente. Quando aplicado a uma superfície

20 vegetal, o glifosato se move de forma sistêmica ao longo da planta. O glifosato é tóxico para as plantas bloqueando a via do ácido shikímico que fornece um precursor para a síntese de aminoácidos aromáticos. Especificamente, o glifosato afeta a conversão do fosfoenolpiruvato e do ácido 3-fosfoshikímico em 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato através da inibição da en-

25 zima 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintase (referida posteriormente aqui como EPSP sintase ou EPSPS). Para as finalidades da presente invenção, deve ser considerado que o termo "glifosato" incluam qualquer forma eficiente como herbicida da N-fosfonometilglicina (incluindo qualquer sal da mesma) e outras formas que resultam na produção do ânion de glifosato *in plan-*

30 *ta*. O glifosato na forma de N-fosfonometilglicina e seus sais são utilizados como componentes de meios de cultura sintéticos para a seleção de tolerância bacteriana e vegetal ao glifosato ou utilizados para determinar a resistên-

cia à enzima em ensaios bioquímicos *in vitro*. Os exemplos de formulações comerciais de glifosato incluem, sem restrição, as vendidas pela Monsanto Company sob os nomes comerciais de herbicidas ROUNDUP®, ROUNDUP® ULTRA, ROUNDUP® ULTRAMAX, ROUNDUP® CT, 5 ROUNDUP® EXTRA, ROUNDUP® BIACTIVE, ROUNDUP® BIOFORCE, RODEO®, POLARIS®, SPARK® e ACCORD®, dos quais todos contêm glifosato na forma de seu sal de isopropilamônio; as vendidas pela Monsanto Company na forma dos herbicidas ROUNDUP® DRY e RIVAL®, que contêm o glifosato na forma de seu sal de amônio; a vendidas pela Monsanto 10 Company na forma de ROUNDUP® GEOFORCE, que contém o glifosato na forma de seu sal de sódio; a vendida pela Monsanto Company na forma de ROUNDUP® WEATHERMAX, que contém o glifosato na forma de seu sal de potássio; e a vendida pela Zeneca Limited na forma do herbicida TOUCHDOWN®, que contém o glifosato na forma de seu sal de trimetil- 15 sulfônio. As formulações do herbicida glifosato podem ser utilizadas de forma segura sobre a superfície de plantas de cultivo tolerantes ao glifosato para controlar ervas daninhas em um campo em proporções tão baixas quanto 5,6 gramas/acre (8 onças/acre) e até 44,8 gramas/acre (64 onças/acre). Experimentalmente, o glifosato foi aplicado em plantas de 20 cultivo tolerantes ao glifosato em proporções tão baixas quanto 2,8 gramas/acre (4 onças/acre) e de até ou excedendo 89,6 gramas/acre (128 onças/acre) sem danos substanciais às plantas de cultivo. A seleção das proporções de aplicação para uma formulação de glifosato que constituem uma dose biologicamente eficiente está dentro da perícia do técnico agrícola 25 comum. Para ilustrar que a produção de plantas transgênicas com resistência a herbicida é uma capacidade dos versados na técnica, é feita referência às Publicações de Pedidos de Patentes U.S. 2003/0106096A1 e 2002/0112260A1 e às Patentes U.S. Nºs 5.034.322; 6.107.549 e 6.376.754, das quais todas são incorporadas aqui como referência. A presente invenção 30 fornece uma planta de milho com maior teor de lisina e é opcionalmente tolerante ao glifosato.

Durante a transformação, o DNA exógeno pode ser introduzido

de forma aleatória, isto é, em uma localização não específica, no genoma da planta. Em alguns casos, pode ser útil direcionar uma inserção de DNA exógeno com a finalidade de se conseguir uma integração específica ao sítio, por exemplo, para substituir uma seqüência ou uma região gênica existente no genoma. Em alguns outros casos pode ser útil direcionar a integração de um DNA exógeno no genoma em um sítio pré-determinado partindo do qual é sabido que a expressão gênica ocorre. Há vários sistemas de recombinação específicos ao sítio conhecidos por funcionarem em plantas que incluem Cre/lox como descrito na Patente U.S. Nº 4.959.317 e FLP/FRT como descrito na Patente U.S. Nº 5.527.695, ambas incorporadas aqui como referência.

Os genes marcadores que podem ser selecionados úteis incluem aqueles que conferem resistência a antibióticos tais como ampicilina, canamicina (nptII), higromicina B (*aph IV*) e gentamicina (*aac3* e *aacC4*) genes marcadores que podem ser selecionados que são descritos nas Patentes U.S. Nºs 5.550.318; 5.633.435; 5.780.708 e 6.118.047, das quais todas são incorporadas aqui como referência. Os marcadores que podem ser detectados que fornecem uma capacidade de identificação visual de transformantes também podem ser empregados, por exemplo, um gene que expressa uma proteína colorida ou fluorescente tal como uma luciferase ou uma proteína fluorescente verde (GFP) ou um gene que expressa uma *beta*-glucuronidase ou o gene *uidA* (GUS) para os quais são conhecidos vários substratos cromogênicos.

Supressão gênica

Os constructos de DNA da presente invenção fornecem a expressão de uma molécula de supressão gênica de RNA anti-sentido específica ao gene LKR endógeno (lisina-cetoglutarato redutase (LKR, uma enzima bifuncional em plantas, também conhecida como sacaropina desidrogenase, SDH) e uma célula vegetal transgênica. Tal constructo de DNA compreende um promotor ativo no tecido direcionado para a supressão enzimática e um elemento de DNA que pode ser transcrito que possui uma seqüência que é complementar à seqüência de polinucleotídeo de um gene LKR direcionado

para a supressão. O elemento gênico direcionado copiado para uso no DNA que pode ser transcrito no constructo de supressão gênica pode ser um elemento promotor, um elemento de íntron, um elemento de éxon, um elemento de UTR a 5' ou um elemento de UTR a 3'. Embora seja acreditado

5 que o tamanho mínimo do DNA copiado partindo da seqüência de um gene direcionado para a supressão tenha aproximadamente 21 ou 23 nucleotídeos; são preferidos segmentos de nucleotídeos maiores, por exemplo, até o comprimento total de um gene direcionado. O elemento de DNA pode compreender várias partes de um gene, por exemplo, nucleotídeos que são

10 complementares a elementos gênicos contíguos ou separados de UTR, éxon e íntron. Tais constructos podem ainda compreender outros elementos reguladores, DNA que codifica peptídeos de sinal, peptídeos de sinal, marcadores seletivos e marcadores que podem ser detectados quando desejado. Para formar uma alça de RNA com orientação anti-sentido o elemento de

15 DNA complementar tem, de forma conveniente, não mais que aproximadamente a metade do comprimento do elemento de DNA com orientação anti-sentido, freqüentemente não mais que um terço do comprimento do dito elemento de DNA com orientação anti-sentido, por exemplo, não mais que um

20 quarto do comprimento do dito elemento de DNA com orientação anti-sentido. Os comprimentos totais dos elementos de DNA combinados podem variar. Por exemplo, o elemento de DNA com orientação anti-sentido pode consistir em 500 até 5000 nucleotídeos e o elemento de DNA complementar pode consistir em 50 até 500 nucleotídeos.

A unidade de transcrição anti-sentido pode ser planejada para

25 suprimir vários genes ou membros de uma família de genes em que o DNA está combinado com dois ou mais elementos com orientação anti-sentido partindo de genes diferentes direcionados para a supressão seguidos por um elemento com orientação senso complementar, por exemplo, complementar a pelo menos uma parte do elemento anti-sentido mais a 5'.

30 A supressão gênica inclui qualquer um dos métodos bem-conhecidos para a supressão da transcrição de um gene ou para o acúmulo do mRNA que corresponde a tal gene prevenindo assim a tradução do pro-

duto da transcrição na proteína. A supressão gênica pós-transcrição é mediada pela transcrição do DNA recombinante integrado para formar o RNA de filamento duplo (dsRNA) que possui homologia a um gene direcionado para a supressão. Esta formação do dsRNA resulta mais comumente da transcrição de uma repetição invertida integrada do gene alvo e é uma característica comum dos métodos de supressão gênica conhecidos como supressão anti-sentido, co-supressão e interferência de RNA (RNAi). A supressão da transcrição pode ser mediada por um dsRNA transcrito que possui homologia com uma sequência de DNA promotora para realizar o que é chamada de supressão em *trans* do promotor.

Mais particularmente, a supressão gênica pós-transcrição através de inserção de um constructo de DNA recombinante com o DNA com orientação anti-sentido para regular a expressão gênica em células vegetais é descrita na Patente U.S. Nº 5.107.065 (Shewmaker e outros) e na Patente U.S. Nº 5.759.829 (Shewmaker e outros). As plantas transgênicas transformadas utilizando tais constructos de DNA com orientação anti-sentido para a supressão gênica podem compreender o DNA integrado disposto na forma de uma repetição invertida que resulta da inserção de um constructo de DNA nas plantas por transformação mediada por *Agrobacterium*, que é descrita por Redenbaugh e outros (1992). As inserções repetidas invertidas podem compreender uma parte ou toda o constructo do T-DNA, por exemplo, uma repetição invertida de uma unidade de transcrição completa ou uma repetição invertida de uma sequência de término da transcrição. A seleção do DNA inserido que compreende os elementos de repetição invertidos pode aumentar a eficiência de identificação de eventos de transcrição eficientes para o silenciamento gênico seja o constructo de transformação um constructo de DNA anti-sentido simples que tem que ser inserida em várias cópias ou um constructo de DNA com repetições invertidas complexa (por exemplo, um constructo de RNAi) que pode ser inserida na forma de uma única cópia. Um constructo de DNA da presente invenção pode conter uma repetição invertida inserida dentro de um elemento regulador, por exemplo, um íntron. A repetição invertida compreendendo uma molécula de DNA que é

homóloga e complementar a um gene LKR endógeno da célula vegetal hospedeira. Na presente invenção, uma molécula de DNA (SEQ ID NO: 9, dsSDH bfx, também referida como LKR dsRNA bfx) é homóloga a uma parte do DNA que codifica um LKR/SDH de *Zea mays* (SEQ ID NO: 2) e é utilizada para suprimir a expressão dos genes LKR/SDH nativos do milho. A anotação bfx se refere a uma sequência de molécula de dsRNA utilizada para a supressão gênica que foi especificamente selecionada através de uma análise da molécula alvo e da exclusão de sequências alvos relacionadas encontradas em alguns outros organismos. Em alguns constructos descritas aqui, o fragmento LKR dsRNA bfx é inserido em um íntron (Zm.LKR dsRNA bfx inserido em I-Zm.DnaK, SEQ ID NO: 10). Os polinucleotídeos adicionais homólogos e complementares à sequência gênica de LKR de *Zea mays* podem ser selecionados para uso na presente invenção.

A supressão conseguida através das mutações de inserção criadas por elementos de transposição pode também impedir a função gênica. Por exemplo, em muitas plantas dicotiledôneas, a transformação com o T-DNA de *Agrobacterium* pode ser facilmente conseguida e grandes números de plantas transformadas podem ser rapidamente obtidos. Ainda, algumas espécies tal como *Zea mays* possuem linhagens com elementos de transposição ativos que podem ser eficientemente utilizados para a produção de grandes números de mutações de inserção, enquanto que algumas outras espécies não possuem tais opções. As plantas mutantes produzidas por mutagênese com *Agrobacterium* ou com transposon e que possuem expressão alterada de um polipeptídeo de interesse podem ser identificadas utilizando os polinucleotídeos da presente invenção. Por exemplo, uma grande população de plantas mutadas pode ser selecionada com os polinucleotídeos que codificam o polipeptídeo de interesse para detectar plantas mutadas que possuem uma inserção no gene que codifica o polipeptídeo de interesse.

Moléculas de Proteína

Proteínas da presente invenção que representam proteínas inteiras ou pelo menos uma parte suficiente da proteína inteira para conferir a atividade biológica relevante da proteína, por exemplo, maior teor de lisina

em um grão de milho transgênico. O termo "proteína" inclui ainda moléculas que consistem de uma ou mais cadeias polipeptídicas. Assim, uma proteína útil na presente invenção pode constituir um produto gênico inteiro ou uma ou mais partes funcionais de uma proteína natural que fornece a característica agrônômica desta invenção, isto é, maior teor de lisina.

Os homólogos das proteínas da presente invenção podem ser identificados através da comparação da seqüência de aminoácidos das proteínas DHDPS (SEQ ID NO: 7) ou aspartato quinase (SEQ ID NO: 8) com as seqüências de aminoácidos da mesma ou de uma planta diferente ou de fontes bacterianas, por exemplo, de forma manual ou através da utilização de algoritmos de busca conhecidos baseados na homologia tais como os comumente conhecidos e referidos como BLAST, FASTA e Smith-Waterman.

Um aspecto adicional da invenção fornece seqüências codificadoras que codificam proteínas homólogas funcionais que diferem em um ou mais aminoácidos daqueles das proteínas DHDPS ou aspartato quinase fornecidas aqui como o resultado de uma ou mais das substituições de aminoácidos conservativas bem-conhecidas, por exemplo, a valina é um substituto conservativo da alanina e a treonina é um substituto conservativo para a serina. Quando uma proteína homóloga é expressa em uma planta transgênica, a proteína homóloga afetará a planta transgênica de uma maneira substancialmente equivalente à das proteínas DHDPS ou aspartato quinase.

As substituições conservativas de um aminoácido dentro da seqüência de proteína nativa podem ser selecionadas de outros membros de uma classe à qual o aminoácido que ocorre naturalmente pertence. Os aminoácidos representativos dentro destas várias classes incluem, mas não estão limitados a: (1) aminoácidos ácidos (carregados negativamente) tais como ácido aspártico e ácido glutâmico; (2) aminoácidos básicos (carregados positivamente) tais como arginina, histidina e lisina; (3) aminoácidos polares neutros tais como glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina; e (4) aminoácidos não polares neutros (hidrofóbicos) tais como alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metioni-

na. Os substitutos conservados para um aminoácido dentro de uma seqüência de aminoácidos nativa podem ser selecionados de outros membros do grupo ao qual o aminoácido que ocorre naturalmente pertence. Por exemplo, um grupo de aminoácidos que possui cadeias laterais alifáticas é constituído de glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; um grupo de aminoácidos que possui cadeias laterais de hidroxila alifáticas é constituído de serina e treonina; um grupo de aminoácidos que possuem cadeias laterais contendo amida é constituído de asparagina e glutamina; um grupo de aminoácidos que possui cadeias laterais aromáticas é constituído de fenilalanina, tirosina e triptofano; um grupo de aminoácidos que possui cadeias laterais básicas é constituído de lisina, arginina e histidina; e um grupo de aminoácidos que possui cadeias laterais que contêm enxofre é constituído de cisteína e metionina. Os grupos de substituição de aminoácidos naturalmente conservativa são: valina-leucina, valina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, ácido aspártico-ácido glutâmico e asparagina-glutamina.

Um aspecto adicional da invenção compreende proteínas que diferem em um ou mais aminoácidos daqueles de seqüências de proteínas DHDPs ou aspartato quinase como o resultado da deleção ou da inserção de um ou mais aminoácidos em uma seqüência nativa. Quanto tal proteína homóloga é expressa em uma planta transgênica, a proteína homóloga afetará a planta transgênica de uma maneira substancialmente equivalente, por exemplo, resultará em um maior teor de lisina no grão de milho.

As proteínas da presente invenção que são variações das proteínas fornecidas aqui geralmente demonstrarão identidade significativa com as proteínas fornecidas aqui, tal como pelo menos 50% ou mais, por exemplo, pelo menos 60% ou 70% de identidade com as proteínas DHDPs ou aspartato quinase. As proteínas úteis incluem ainda aquelas com porcentagem de identidade maior com os aminoácidos em um segmento de proteína das proteínas DHDPs ou aspartato quinase, por exemplo, 80%, 90%, 95%, 98% ou até 99% de identidade.

Métodos de Transformação e Plantas

Como utilizado aqui, o termo "milho" significa *Zea mays*, também

conhecido como milho e inclui todas as variedades de plantas que podem ser cruzadas com o milho, incluindo espécies selvagens de milho.

Os métodos e as composições para a transformação de plantas através da introdução de um DNA exógeno no genoma de uma planta na prática desta invenção podem incluir qualquer um dos métodos bem-
5 conhecidos e demonstrados. Os métodos preferidos de transformação de plantas são o bombardeio de microprojéteis como ilustrado nas Patentes U.S. N^{os} 5.015.580; 5.550.318; 5.538.880; 6.160.208; 6.399.861 e 6.403.865 e a transformação mediada por *Agrobacterium* como ilustrado nas Patentes
10 U.S. N^{os} 5.635.055; 5.824.877; 5.591.616; 5.981.840 e 6.384.301 e na Publicação de Patente U.S. 20030196219, das quais todas são incorporadas aqui como referência. A transformação mediada por micropartículas se refere ao fornecimento do DNA revestido sobre micropartículas que são propelidas para dentro dos tecidos alvos através de vários métodos. A transformação
15 mediada por *Agrobacterium* é conseguida através do uso de uma bactéria do solo engenheirada geneticamente que pertence ao gênero *Agrobacterium*. Várias espécies de *Agrobacterium* medeiam a transferência de um plasmídeo de DNA específico conhecido como "T-DNA", que pode ser engenheirado geneticamente para carregar qualquer pedaço desejado de DNA para
20 dentro de muitas espécies vegetais.

Como utilizado aqui um organismo "transgênico" é um cujo genoma compreende um DNA exógeno ou um DNA isolado. O organismo transgênico pode ser uma planta, um animal, um inseto, um fungo, uma bactéria ou um vírus. Como utilizado aqui "planta transgênica" significa uma
25 planta transformada de forma estável ou uma progênie de planta de qualquer geração subsequente que descende da mesma, em que o DNA da planta ou a progênie da mesma contém um DNA exógeno. A planta transgênica pode conter adicionalmente seqüências que são nativas à planta que será transformada, mas em que o DNA exógeno foi alterado com a finalidade de de alterar o nível ou o padrão de expressão do gene.
30

Como utilizado aqui, uma planta transformada "de forma estável" é uma planta em que o DNA exógeno pode ser herdado. O DNA exógeno

pode ser herado na forma de um fragmento de DNA mantido na célula vegetal e não inserido dentro do genoma do hospedeiro. Preferencialmente, a planta transformada de forma estável compreende o DNA exógeno inserido dentro do DNA cromossômico no núcleo, nas mitocôndrias ou no cloroplasto, mais preferencialmente no DNA cromossômico nuclear.

Como utilizado aqui uma "planta transgênica R₀" é uma planta que foi transformada diretamente com um DNA exógeno ou foi regenerada partindo de uma célula, um calo ou um aglomerado de células que foi transformado com um DNA exógeno. Como utilizado aqui "progênie" significa qualquer geração subsequente, incluindo as sementes e as plantas provenientes das mesmas, que é derivada de uma planta parental particular ou de um conjunto de plantas parentais; a progênie resultante pode ser altamente hibridizada ou substancialmente homozigota, dependendo do pedigree. A progênie de uma planta transgênica desta presente invenção pode ser, por exemplo, autopolinizada, cruzada com outra planta transgênica, cruzada com uma planta não transgênica e/ou retrocruzada com um ancestral.

As sementes das plantas desta invenção podem ser colhidas partindo de plantas transgênicas férteis e podem ser utilizadas para o cultivo de gerações de progênie de plantas desta invenção, incluindo uma linhagem de planta híbrida que compreende em seu genoma um constructo de DNA exógeno como listado na Tabela 1 da presente invenção, que fornece o benefício de maior teor de lisina no grão de milho e opcionalmente tolerância ao herbicida glifosato.

Um "evento" transgênico é produzido através da transformação de uma célula vegetal com um constructo de DNA exógeno, a regeneração de uma planta resultando da inserção específica do DNA exógeno no genoma da planta e da seleção de uma planta particular caracterizada pelo DNA do evento. Cada evento é, portanto, um indivíduo exclusivo que pode ser distinguido de outros eventos pela localização específica da inserção genômica do constructo de DNA exógeno da presente invenção. A detecção do DNA do evento é realizada através de um número de métodos de detecção de DNA conhecidos na técnica e podem ser realizados em tecidos vegetais,

sementes e produtos processados do evento que contém o DNA. Tipicamente, um número de células vegetais é transformado, cada uma representando potencialmente um evento de integração diferente, produzindo uma população de plantas das quais uma planta particular é selecionada. Uma vez que

5 o locus de integração é geralmente estável ao longo de ciclos repetidos de reprodução vegetal, o termo "evento" se refere ao transformante R_0 original e à progênie do transformante que incluem o DNA exógeno inserido em uma localização particular e exclusiva no genoma, isto é, o DNA do evento. A progênie produzida através de um cruzamento sexual, um autocruzamento

10 ou um retrocruzamento repetido, em que pelo menos uma das plantas utilizadas no cruzamento é descendente em qualquer geração do transformante R_0 original, contém o mesmo DNA do evento.

No processamento das sementes e do grão desta invenção para a produção de produtos alimentícios e para alimentação, as estruturas do

15 tecido vegetal normal serão destruídas, as células vegetais podem ser rompidas e o DNA nativo e os cassetes de expressão vegetal exógenos podem não permanecer totalmente intactos, particularmente quando são utilizadas altas temperaturas, solventes de extração e similares. Entretanto, os produtos processados exclusivos possíveis através da prática desta invenção po-

20 dem ser rapidamente identificados como compreendendo fragmentos do DNA nativo e fragmentos dos cassetes de expressão vegetal exógenos. Por "fragmentos" entendem-se segmentos de DNA que podem ser isolados ou amplificados com pelo menos 20 pares de bases de comprimento. Tais fragmentos podem ser seqüenciados ou mapeados com enzimas de restri-

25 ção para confirmar a identidade de seqüência com o DNA nativo ou os cassetes de expressão exógenos do material de partida.

EXEMPLOS

Os exemplos a seguir são incluídos para demonstrar os exemplos de certas modalidades preferidas da presente invenção. Deve ser con-

30 siderado pelos versados na técnica que as técnicas descritas nos exemplos a seguir representam as abordagens que os inventores descobriram que funcionavam bem na prática da presente invenção e assim podem ser con-

sideradas como constituindo os exemplos dos meios preferidos para a prática da mesma. Entretanto, os versados na técnica devem, à luz da presente descrição, considerar que muitas alterações podem ser feitas nas modalidades específicas que são descritas e ainda se obter um resultado igual ou similar sem sair do espírito e do âmbito da invenção.

Exemplo 1

Constructos de DNA e transformação de plantas

Os constructos de DNA da presente invenção compreendem moléculas reguladoras ligadas ao DNA de interesse. Em particular, um constructo de DNA compreende um promotor, um íntron, um líder a 5', uma molécula codificadora ou não codificadora e uma região não traduzida a 3'. Os constructos de DNA da presente invenção foram preparadas utilizando vários métodos e ferramentas moleculares, por exemplo, os descritos em Sambrook e outros e variações destes métodos que são conhecidos pelos versados na técnica de manipulação de DNA podem ser realizadas para a produção de constructos substancialmente similares. Os métodos tais como métodos de amplificação pela PCR, clonagem e subclonagem foram utilizados para ligar de forma operacional promotores, líderes, íntrons, peptídeos de trânsito, moléculas codificadoras, moléculas não codificadoras e regiões não traduzidas a 3' que são listados na Tabela 1 em configurações operacionais e adicionalmente ilustrados nas Figuras 1-6. Os constructos de DNA foram clonadas em uma ou mais estruturas de plasmídeo apropriadas para uso na transformação mediada por *Agrobacterium* de células de milho, embora outras estruturas de plasmídeo possam ser selecionadas, por exemplo, plasmídeos com alto número de cópias para o isolamento de fragmentos de DNA para a transformação mediada por pistola de partículas ou plasmídeos que são compatíveis com outros hospedeiros bacterianos. Trinta e cinco constructos listados na Tabela 1 foram feitas para testar as combinações de estratégias de expressão do polipeptídeo DHDPs resistente ao "feedback" de lisina (SEQ ID NO: 7) e a repressão do catabolismo da lisina através da supressão gênica do gene LKR/SDH endógeno do milho (SEQ ID NO: 2) ou a expressão de uma aspartato quinase (SEQ ID NO: 8). Por exemplo, estas

- estratégias incluíam: 1) a expressão do LKR-dsRNA no embrião; 2) a expressão tanto do polipeptídeo de DHDPS quanto do LKR-dsRNA no embrião; 3) a expressão tanto do polipeptídeo de DHDPS quanto do LKR-dsRNA no endosperma; 4) a expressão do polipeptídeo de DHDPS no endosperma e do LKR-dsRNA no embrião; 5) a expressão do polipeptídeo de DHDPS e da aspartato quinase e a expressão do LKR-dsRNA.

Preparação de plantas transgênicas

- Tecidos de milho (linhagens LH198 ou LH244 intracruzadas) que compreendem embriões imaturos ou calos são isolados para a transformação e os constructos de DNA da presente invenção são inseridas no genoma do milho utilizando os métodos de transformação mediada por *Agrobacterium* (por exemplo, Patentes U.S. N^{os} 5.635.055; 5.824.877; 5.591.616; 5.981.840 e 6.384.301, das quais todas são incorporadas aqui como referência). *Agrobacterium* transformada para compreender os constructos de DNA listados na Tabela 1 é inoculada no tecido de milho. Após a exposição às bactérias transformadas, são utilizados protocolos de transformação padronizados para a propagação e para a seleção de células de milho transformadas utilizando meios suplementados com o herbicida glifosato. Após a seleção de células que sobrevivem à exposição ao herbicida glifosato, as plantas transgênicas R₀ foram regeneradas até a maturidade. As sementes são coletadas de plantas transgênicas férteis após o autocruzamento ou o cruzamento com uma segunda planta de milho. As análises moleculares são realizadas para a caracterização das inserções transgênicas. A PCR, o Southern blotting, o ensaio Taqman® ou outras metodologias conhecidas pelos versados na técnica da biologia molecular são utilizadas para a identificação de eventos que compreendem inserções intactas isoladas dos constructos de DNA ou análise de zigosidade. A semente da progênie é plantada e as plantas da progênie cultivadas para a análise de lisina dos tecidos e da semente da progênie.

Exemplo 2

Determinação do teor de lisina dos tecidos e da semente de milho

Vários métodos são úteis para a determinação do teor de lisina

de tecidos vegetais, sementes e produtos processados, por exemplo, na presente invenção a cromatografia líquida-espectrofotometria de massa/espectrofotometria de massa (LC-MS-MS) foi utilizada para analisar a lisina livre (partes por milhão, ppm) nos grãos de milho dos vários eventos

5 identificados como transformados com um constructo de DNA como listado na Tabela 1 e os resultados desta análise são descritos na Tabela 2. As amostras de grãos de milho maduros individuais de cada evento foram primeiramente pesadas, moídas até um pó homogêneo fino e extraídas com um solvente de extração compreendendo metanol, água e ácido fórmico. Nas

10 situações em que os grãos estavam a granel, foram utilizados aproximadamente 30 mg de pó moído. Ambas as técnicas de cromatografia líquida e espectrométrica de massa com monitoramento de várias reações (MRM) foram utilizadas para separar a lisina no extrato de amostra. Após a separação, a lisina foi quantificada utilizando sua área de pico na espectrometria de

15 massa contra sua curva de calibração padrão correspondente que foi preparada utilizando um padrão interno (IS) de d_4 -lisina com adição de deutério.

Em um outro método, o teor de lisina dos grãos de milho se baseava na avaliação dos aminoácidos livres através da cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Os grãos individuais ou os conjuntos de grãos

20 de cada evento foram moídos até um pó homogêneo fino como descrito e neste caso, foram utilizados aproximadamente 30 mg do pó para a análise. Os aminoácidos foram extraídos com ácido tricloroacético a 5% e a detecção de aminoácido foi conseguida através de uma derivatização da amina primária pré-coluna com o-ftalaldeído (OPA). Utilizando a cromatografia em fase

25 inversa, a separação é conseguida através da hidrofobicidade dos grupos R localizados em cada aminoácido. Para ajudar a estabilizar o fluoróforo, é adicionado um tiol tal como 2-mercaptoetanol ($SHCH_2CH_2OH$) ou ácido 3-mercaptopropiônico ($SHCH_2CH_2COOH$).

Foi calculada a média dos níveis de lisina livre (ppm) medidos

30 nos eventos transgênicos produzidos através da transformação com cada uma dos constructos e estão resumidos na Tabela 1. É também identificada a geração da semente (F1, F2, F3 e F4) analisada. As medidas do nível de

- lisina livre na semente R1 de eventos transgênicos de milho contendo pMON80378 são apresentadas na Tabela 2. Os níveis de lisina eram surpreendentemente altos em 5 dos 6 eventos analisados. Os níveis de lisina podem ser adicionalmente ajustados através do cruzamento de eventos de milho que contêm várias combinações dos cassetes de expressão vegetal descritas na tabela 1 de forma que a semente híbrida do cruzamento dos parentais contendo um ou mais dos cassetes de expressão possui o nível de lisina desejado. Os parentais intracruzados que contêm, por exemplo, os cassetes de expressão de CordapA e de *lysC* de *E. coli* (do tipo selvagem ou Ec.lysC.mut, SEQ ID NO: 11, uma molécula de DNA que codifica uma proteína modificada em quatro posições, S2A, C58G, T352I e A401G) podem ser cruzados com o cassete de expressão de LKR dsRNA para a produção de uma semente de progênie híbrida com níveis de lisina que são mais que aditivos do que os níveis de lisina da semente de qualquer um dos parentais.
- Outras combinações, tal como um parental CordapA e aquele contendo LKR dsRNA, podem ser cruzadas com um parental LysC ou um parental LysC e LKR pode ser cruzado com um parental CordapA para fornecer níveis de lisina altos inesperados na semente híbrida.

Tabela 1. Média de lisina (ppm) por geração analisada partindo de estufas e vários testes de campo.

Genótipo	F1	F2 (R1)	F3 (R2)	F4 (R3)
1. pMON65178: P-Zm.semente/I-Os.Act1/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA /T-3'UTR				
LH198/Hill	-	1720 ppm	1825 ppm	2133 ppm
2. pMON66568: P-CI.Gcx/I-Os.Act1/Zm.LKR anti-sentido /T-3'UTR				
LH198/Hill	-	31 ppm	56 ppm	-
3. pMON66646: P-CI.Gcx/I-Os.Act1/Zm.LKR-dsRNA/T-3'UTR				
LH198/Hill		1279 ppm	1893 ppm	2575 ppm
4. pMON66649: P-Zm.B32/I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA/T-3'UTR > <P-CI.Gcx/ I-Os.Act1/Zm.LKR-dsRNA/T-3'UTR				
LH198/Hill	-	1871 ppm	4556 ppm	-
5. pMON79454: P-Zm.L3/ I-Zm.DnaK / TS-Zm.DapA-CORgl.dapA /3'UTR				
LH244	862 ppm	1274 ppm	3084 ppm	-
6. pMON80002: P-Zm.semente/I-Zm.Adh1/Zm.LKR-dsRNA/T-3'UTR				
LH244	38 ppm	147 ppm	330 ppm	-
7. pMON80003: P-Zm.L3/ I-Zm.DnaK /TS-Zm.DapA-CORgl.dapA /T-3'UTR> < P-Zm.semente/I-Zm.Adh1/Zm.LKR dsRNA/T-3'UTR				
LH244	1660 ppm	2223 ppm	4213 ppm	-

Continuação

8. pMON80000: P-L3/ I-Zm.DnaK /TS-Zm.DapA-CORgl.dapA /T-3'UTR				
LH244	-	1157 ppm	2560 ppm	-
9. pMON80001: P-Cl.Gcx/ I-Zm.DnaK /TS-Zm.DapA-CORgl.dapA/T-3'UTR				
LH244	22 ppm	44 ppm	-	-
10. PMON80354: P-Cl.Gcx/I-Zm.DnaK / TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno / T-3'UTR				
LH244	27 ppm	47 ppm	-	-
11. PMON80355: P-Zm.L3/ I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno /T- 3'UTR				
LH244	930 ppm	2065 ppm	-	-
12. PMON79901: P-Zm.Em/I-Zm.Adh1/Ec.lysC/T-Ps.RbcS2:E9> <P-Zm.L3/I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA /T-3'UTR				
LH244	1385 ppm	3685 ppm	-	-
13. PMON79900: P-Zm.L3/ I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA /3'UTR >< P-Zm.Em/I-Zm.Adh1/Ec.lysC/3'UTR				
LH244	2150 ppm	3688 ppm	-	-
14. PMON79464: P-Zm.B32/I-Zm.Adh1/Zm.LKR dsRNA/T-3'UTR				
LH244	159 ppm	720 ppm	567 ppm	-
15. PMON79465: P-Zm.B32/I-Zm.Adh1/ fragmento interno de Zm.LKR dsRNA/T-3'UTR> <P-Cl.Gcx/ I-Zm.DnaK /TS-Zm.DapA-CORgl.dapA/T-3'UTR				
LH244	1470 ppm	3171 ppm	4158 ppm	-
16. PMON74130: P-Cl.Gcx/I-Os.Act1/LKR-dsRNA/T-3'UTR> <PZm.B32/ I-Zm.DnaK / TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno/T-3'UTR				
LH244	-	3443 ppm		
17. pMON80371: P-Zm.B32/I-Zm.Adh1/Ec.lysC/T-3'UTR><P-Zm.Gcx/ I-Zm.DnaK / TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno /T-3'UTR				
LH244	-	-		
18. pMON80374:P-Zm.B32/ I-Zm.Adh1/Ec.lysC/3'UTR><P-Cl.Gcx/ I-Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno /T-Ta.hsp17				
LH244	-	-		
19. pMON80378: P-Zm.B32/ I-Zm.Adh1 /Ec.lysC/3'UTR ><P-Zm.Gcx/ I-Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno /3'UTR > <P-Zm.semente/ fragmento interno de Zm.LKR dsRNA /T-3'UTR				
LH244	-	8974 ppm	-	
20. pMON93072: P-Zm.B32/ fragmento interno de Zm.LKR dsRNA inserido em I-Zm.DnaK /TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno /3'UTR><P-Zm.Gcx/I-Zm.Adh1/Ec.lysC/T-3'UTR				
LH244				
21. pMON93073:P-Cl.Gcx/I-Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno /3'UTR><P-Zm.B32/ I-Zm.Adh1 / fragmento interno de Zm.LKR dsRNA / T-3'UTR				
LH244	-	-		
22. pMON93066: P-B32/ fragmento interno de Zm.LKR dsRNA inserido em I-Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno/ T-3'UTR				
LH244	-	3648 ppm	-	
23. pMON93067: P-B32/ fragmento interno de Zm.LKR dsRNA inserido em I-Zm.DnaK / TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno /T-3'UTR				
LH244				

Continuação

24. pMON93063: P-Zm.B32/I-Zm.Adh1 / fragmento interno de Zm.LKR dsRNA /T-3'UTR > <P-CI.Gcx/I-Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno/T-3'UTR				
LH244				
25. pMON93064: P-Zm.Em/ I-Zm.Adh1 /Ec.lysC/3'UTR > <P-Zm.L3/ I-Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno)/ T-3'UTR				
LH244				
26. pMON80370: P-Zm.L3/ fragmento interno de Zm.LKR dsRNA inserido em I-Zm.DnaK /TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno /T-3'UTR				
LH244	-	645 ppm	-	
27. pMON79469: P-Zm.B32/ I-Zm.Adh1 /Zm.LKR-dsRNA/ 3'UTR><P-CI.Gcx/I-Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-Zm.DHDPS/ T-3'UTR				
LH244	-	182 ppm	-	-
28. pMON79470: P-Zm.B32/ I-Zm.Adh1 /fragmento interno de Zm.LKR/3'UTR><P-CI.Gcx/I-Zm.DnaK /TS-Zm.DapA-DHDPS/T-3'UTR				
LH244	-	368 ppm	-	-
29. pMON93065:P-Zm.semente/ I-Zm.Adh1 /fragmento interno de Zm.LKR / 3'UTR > <P-Zm.L3/ I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno/T-3'UTR				
LH244				
30. pMON93092: P-CI.Gcx/I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno/T-Ta.Hap17><P-Zm.B32/I-Zm.Adh1/Zm.LKR dsRNA bfx/T-3'UTR				
LH244			4478 ppm	
31. pMON93093: P-Zm.B32/I-Zm.DnaK-LKR dsRNA bfx -I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno/T-Ta.Hap17				
LH244			3041 ppm	
32. pMON93083: P-CI.Gcx/I-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA- CORgl.dapA.nno /T-Ta.Hsp17, P-Zm.B32/I-Zm.Adh1/Zm.LKR dsRNA bfx/T-3'UTR>				
LH244				
33. pMON93084: P-CI.Gcx/I-Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno/T-Ta.Hsp17, P-Zm.B32/I-Zm.Adh1/Zm.LKR dsRNA bfx)/T-3'UTR>				
LH244				
34. pMON80380: RB <P-CI.Gcx/I-Zm.Adh1/Ec.lysC/T-Ps.RbcS2:E9><P- Zm. B32/I-Zm.DnaK-Zm.LKR dsRNA-Zm.DnaK/ TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno/T-Ta.hHsp17>				
LH244				
35. pMON74138: P-Zm.B32/I-Zm.DnaK-Zm.LKR dsRNA-Zm.DnaK/TS-Zm.DapA-CORgl.dapA.nno / TS-Zm.DapA-Ec.lysC/T-Ta.Hsp17>				
LH244				

Tabela 2. Níveis de lisina medidos nos eventos R1 transformados com pMON80378

<u>EVENTO DE MILHO</u>	<u>NÍVEL DE LISINA LIVRE (PPM)</u>
<u>ZM M118682</u>	<u>16379</u>
<u>ZM M118685</u>	<u>15092</u>
<u>ZM M118686</u>	<u>17878</u>
<u>ZM M118699</u>	<u>18815</u>
<u>ZM M118700</u>	<u>22719</u>
<u>ZM M118702</u>	<u>1832</u>

O teor de lisina dos grãos dos eventos compreendendo

pMON93092 foi também determinado por espectrofotometria de massa em tandem (LC MS-MS) em amostras moídas e extraídas de aproximadamente 20 grãos por espiga. A quantidade de lisina livre em partes por milhão (ppm) nos grãos R2 partindo de um número de eventos de transformação é mostrada nas figura 7 e figura 8. Para os eventos compreendendo pMON93092 como mostrado, os níveis de lisina livre variavam entre aproximadamente 3500-5500 ppm, enquanto que para os eventos compreendendo pMON93093 como mostrado, os níveis variavam entre aproximadamente 1700-6500 ppm. Na maior parte dos casos, duas ou mais espigas por evento foram independentemente medidas e é mostrado o desvio padrão. Em comparação, a média dos níveis de lisina para o milho do tipo selvagem estava entre 50 e 100 ppm.

Um depósito pela Monsanto Technology LLC, de pMON93092 e pMON93093 descritos anteriormente e citados nas reivindicações, foi feito sob o Tratado de Budapeste junto à American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. Os números de acesso da ATCC são PTA-6733 e PTA-6734, respectivamente. O depósito será mantido no depositário durante um período de 30 anos ou 5 anos após o último requerimento ou durante a vida efetiva da patente, seja o que for mais longo e será substituído quando necessário durante tal período.

Todas as publicações, as patentes e os pedidos de patentes são incorporados aqui como referência até a mesma extensão como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado como sendo incorporado como referência.

REFERÊNCIAS

As referências listadas abaixo são incorporadas aqui como referência até a extensão em que suplementam, explicam, fornecem um fundamento para ou ensinam uma metodologia, as técnicas e/ou as composições empregadas aqui.

Patente U.S. Nº 4.810.648; Patente U.S. Nº 4.957.748; Patente U.S. Nº 4.959.317; Patente U.S. Nº 5.015.580; Patente U.S. Nº 5.034.322; Patente U.S. Nº 5.094.945; Patente U.S. Nº 5.100.679; Patente U.S. Nº 5.107.065; Patente U.S. Nº 5.188.642; Patente U.S. Nº 5.219.596; Patente U.S. Nº 5.258.300; Patente U.S. Nº 5.288.300; Patente U.S. Nº 5.322.938; Patente U.S. Nº 5.352.605; Patente U.S. Nº 5.359.142; Patente U.S. Nº 5.362.865; Patente U.S. Nº 5.367.110; Patente U.S. Nº 5.527.695; Patente U.S. Nº 5.530.196; Patente U.S. Nº 5.538.880; Patente U.S. Nº 5.550.318; Patente U.S. Nº 5.591.616; Patente U.S. Nº 5.627.061; Patente U.S. Nº 5.633.435; Patente U.S. Nº 5.635.055; Patente U.S. Nº 5.641.876; Patente U.S. Nº 5.759.829; Patente U.S. Nº 5.773.691; Patente U.S. Nº 5.780.708; Patente U.S. Nº 5.824.877; Patente U.S. Nº 5.837.848; Patente U.S. Nº 5.936.069; Patente U.S. Nº 5.981.840; Patente U.S. Nº 6.005.076; Patente U.S. Nº 6.040.497; Patente U.S. Nº 6.107.549; Patente U.S. Nº 6.118.047; Patente U.S. Nº 6.140.078; Patente U.S. Nº 6.146.669; Patente U.S. Nº 6.156.227; Patente U.S. Nº 6.160.208; Patente U.S. Nº 6.175.060; Patente U.S. Nº 6.177.611; Patente U.S. Nº 6.232.526; Patente U.S. Nº 6.252.138; Patente U.S. Nº 6.294.714; Patente U.S. Nº 6.376.754; Patente U.S. Nº 6.384.301; Patente U.S. Nº 6.399.861; Patente U.S. Nº 6.403.865; Patente U.S. Nº 6.426.446; Patente U.S. Nº 6.429.357; Patente U.S. Nº 6.429.362; Patente U.S. Nº 6.433.252; Patente U.S. Nº 6.437.217; Patente U.S. Nº 6.459.019; Patente U.S. Nº 6.635.806; Patente U.S. Nº 6.660.911; Pedido de Patente U.S. Nº 2002/0112260;

Pedido de Patente U.S. Nº 2003/0056242; Pedido de Patente U.S. Nº 2003/0106096; Pedido de Patente U.S. Nº 2003/0140364; Pedido de Patente U.S. Nº 2003/0196219; Pedido de Patente U.S. Nº 2005/0132437; Pedido de Patente U.S. Nº 2005/0193444;

Patente U.S. Nº de Série 09/757.089

Bonnassie e outros, *Nucleic Acids Res.*, 18: 6421, 1990.

DeBlock e outros, *EMBO J.*, 6: 2513-2519, 1987.

della-Cioppa e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 6873-6877,

5 1986.

Fraley e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4803-4807, 1983.

Klee e outros, *Mol. Gen. Genet.*, 210: 437-442, 1987.

Misawa e outros, *Plant J.*, 4: 833-840, 1993.

Misawa e outros, *Plant J.*, 6: 481-489, 1994.

10 Padgette e outros, Em: *Herbicide Resistant Crops*, Lewis Publishers,
53-85, 1996.

Pedido de Patente PCT WO 0011200A2

Penaloza-Vazquez e outros, *Plant Cell Reports*, 14: 482-487, 1995.

15 Redenbaugh e outros, Em: *Safety Assessment of Genetically Engi-
neered Flavr Savr® Tomato*, CRC Press, Inc., 1992.

Richaud e outros, *J. Bacteriol.*, 166: 297-300, 1986.

Sambrook e outros, Em: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory
Press, Cold Spring Harbor, NY, 2000.

Sathasiivan e outros, *Nucl. Acids Res.*, 18: 2188-2193, 1990.

20 Turner e Foster, *Molec. Biotech.*, 3: 225, 1995.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> MALVAR, THOMAS M.
 HUANG, SHIHSHIEH
 LUETHY, MICHAEL H.

<120> SEMENTE DE PLANTA TRANSGÊNICA COM MAIOR TEOR DE LISINA

<130> MONS:094US

<140> DESCONHECIDO
 <141> 2006-09-22

<150> 60/723,178
 <151> 2005-10-03

<160> 11

<210> 1
 <211> 903
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 1

```

agtacagggtt taacagctaa gaccggagta gagcacttcg gcaccgttgg agtagcaatg   60
gttactccat tcacggaatc cggagacatc gatatcgctg ctggccgcga agtcgcggct   120
tatttggttg ataagggctt ggattctttg gttctcgcgg gcaccactgg tgaatcccca   180
acgacaaccg ccgctgaaaa actagaactg ctcaaggccg ttcgtgagga agttggggat   240
cgggcgaagc tcatcgccgg tgctggaacc aacaacacgc ggacatctgt ggaacttgcy   300
gaagctgctg cttctgctgg cgcagacggc cttttagtgg taactcctta ttactccaag   360
ccgagccaag agggattgct ggcgcacttc ggtgcaattg ctgcagcaac agagggtcca   420
atgtgtctct atgacattcc tggtcggtca ggtattccaa ttgagtctga taccatgaga   480
cgcttgagtg aattacctac gattttggcg gtcaaggacg ccaaggggtga cctcgttgca   540
gccacgtcat tgatcaaaga aacgggactt gcctggtatt caggcgatga cccactaaac   600
cttggttggc ttgctttggg cggatcaggt ttcatttcgg taattggaca tgcagcccc   660
acagcattac gtgagttgta cacaagcttc gaggaaggcg acctcgtcgg tgcgcgggaa   720
atcaacgcca aactatcacc gctggtagct gcccaaggtc gcttggttgg agtcagcttg   780
gcaaaagctg cttcgcgtct gcagggcatc aacgtaggag atcctcgact tccaattatg   840
gctccaaatg agcaggaact tgaggctctc cgagaagaca tgaaaaaagc tggagttcta   900
taa                                                                    903
  
```

<210> 2
 <211> 3183
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 2

atgggttctg ctgctactga gggcaatgac accttgctgg gcaatggagt tgttgggatt 60
 cttgctgaga cttgtaatat gtgggaaaga agggcgccgt taactccttc ccattgtgcc 120
 cgccttctgc taggaggagg caagaacgga cctcgagtaa accggattat tgtgcagcca 180
 agcacaagga ggatccatca tgacgctcag tatgaggatg caggatgcga gatttcagaa 240
 gacctgtcag aatgcggcct tatcataggc atcaaacaac ccaagctgca gatgattctt 300
 tcagatagag cgtacgcttt cttttcacac acacacaaag cccaaaaaga gaatatgcc 360
 ctggttagaca agatccttga agaaaggggtg tccttggttg attatgagct aattgttgga 420
 gatgatggga aaagatcact agcatttggg aaatttgctg gtagagctgg actgatagat 480
 ttcttacatg gtctcggaca gcgatatttg agccttgat actcgactcc atttctctct 540
 ctgggacaat ctcatatgta tccttcgctc gctgcagcca aggctgcagt cattgtcggt 600
 gcagaagaga tagcaacatt tggacttcca tccggaattt gtccgatagt gtttgtgttc 660
 actggagttg gaaacgtctc tcagggtgcg caggagatat tcaagttatt gcccatacc 720
 tttgttgatg ctgagaagct tcccgaaatt ttccaggcca ggaatctgtc taagcaatct 780
 cagtcgacca agagagtatt tcaactttat ggttgtgttg tgacctctag agacatgggt 840
 tctcacaagg atcccaccag acaatttgac aaaggtgact attatgctca tccagaacac 900
 tacaccctg tttttcatga aagaattgct ccatatgcat ctgtcatcgt aaactgtatg 960
 tattgggaga agaggtttcc accattacta aatatggatc agttacagca attgatggag 1020
 actggttgct ctttagtcgg cgtttgtgac ataacttgat atattggagg ttccattgaa 1080
 tttatcaaca agagtacatc aatagagagg cttttctttc ggtatgatcc ttctaagaat 1140
 tcataccatg atgatatgga aggtgccgga gtggtctgct tggctgttga cattctccct 1200
 acagaattct ctaaagaggc ctcccaacat tttggaaaca tactatctag acttggtgct 1260
 agtttggcct cagtgaagca accggcagaa cttccttcct acttgagaag agcttgcatt 1320
 gcacatgctg gcagattaac tcctttgtat gaatatatcc ctaggatgag aaatactatg 1380
 atagatttgg caccgcgaaa aacaaatcca ttgcctgaca agaagtatag caccctggta 1440
 tctctcagtg ggcacctatt tgataagttc cttataaatg aagctttgga catcattgag 1500
 acagctggag gttcatttca cttgggttaga tgtgaagttg gacaaagcac ggatgatatg 1560
 tcatactcag agcttgaagt aggagcagat gatactgcca cattggataa aattattgat 1620
 tccttgactt ctttagctaa tgaacatggt ggagatcacg atgccgggca agaaattgaa 1680
 ttagctctga agataggaaa agtcaatgag tatgaaactg acgtcacaaat tgataaagga 1740
 gggccaaaga ttttaattct tggagctgga agagtctgtc ggccagctgc tgagtttctg 1800
 gcatcttacc cagacatatg tacctatggt gttgatgacc atgatgcaga tcaaattcat 1860
 gttatcgtgg catcttttga tcaaaaagat gcagaagaga cagttgatgg tattgaaaat 1920
 acaactgcta ccagcttga tgttgctgat attggaagcc ttccagatct tgtttctcag 1980
 gttgaggttg taattagctt gctgcctgct agttttcatg ctgccattgc aggagtatgc 2040

atagagttga agaagcacat ggtaacggca agctatgttg atgaatccat gtcaaacttg 2100
 agccaagctg ccaaagatgc aggtgtaact atactttgtg aaatgggcct agatcctggc 2160
 atagatcact tgatgtcaat gaagatgatt gatgaagctc atgcacgaaa gggaaaaata 2220
 aaggcattta catcttactg tgggtggattg ccatctccag ctgcagcaaa caatccgctt 2280
 gcctataaat tcagttggaa ccagctgggt gactccgggt cagggaaaaa tcctgcagtc 2340
 tacaaatttc ttggtgagac gatccatgta gatggtcata acttgatga atcagcaaag 2400
 aggctcagac tacgagagct tccagctttt gctctggaac acttgccaaa tcggaattcc 2460
 ttgatatatg gtgaccttta tggatatctc aaagaagcat ccaccatata tagggctact 2520
 cttcgttacg aagggttttag tgagattatg gtaacccttt caaaaactgg gttctttgat 2580
 gctgcaaatc atccactgct gcaagatact agtcgtccaa catataaggg tttccttgat 2640
 gaactactga ataatatctc cacaattaac acggacttag atattgaagc ctctggtgga 2700
 tacgatgatg acctgattgc cagactgttg aagctcgggt gttgcaaaaa taaggaaata 2760
 gctgttaaga cagtcaaaac catcaagttc ttgggactac atgaagagac tcaaatacct 2820
 aagggttggt cgagccatt tgatgtgatt tgccagcgaa tggaacagag gatggcctat 2880
 ggccacaatg agcaagacat ggtactgctc caccacgaag tcgaggtgga ataccgggac 2940
 gggcaaccgc ccgaaaagca ccaagcgacg ctactggagt tcgggaagggt tgaaaatggc 3000
 aggtccacca ctgccatggc gctgaccgtc ggcattccag cagcaatagg ggccctgcta 3060
 ttgctaaaga ataaggtcca gacgaaagga gtgatcaggc ctctgcaacc ggaaatctac 3120
 gttccagcat tggagatctt ggagtcgtcg ggcacaaagc tgggtgagaa agtggagact 3180
 tga 3183

<210> 3
 <211> 1350
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<400> 3

atggcagaaa ttgttgtctc caaatgtggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg 60
 aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccaacgtgc gtttagttgt cctctcggct 120
 tctgctggta tcactaatct gctggctcgt ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga 180
 ttcgaaaaac tcgacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac 240
 ccgaacgtta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa 300
 gcggcgccgc tggcaacgtc tccggcgctg acagatgagc tggtcagcca cggcgagctg 360
 atgtcgaccc tgctgtttgt tgagatcctg cgcaacgcg atgttcaggc acagtggttt 420
 gatgtacgta aagtgatgcy taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatatagcc 480
 gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgate 540

acccagggat ttatcggtag cgaaaataaa ggctgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc 600
 agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg 660
 accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt 720
 gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttgggtgcaa agtactgcat 780
 ccggcaacgt tgctacccgc agtacgcagc gatatcccgg tctttgtcgg ctccagcaaa 840
 gaccacgcg caggtggtac gctggtgtgc aataaaactg aaaatccgcc gctgttccgc 900
 gctctggcgc ttcgtcgcaa tcagactctg ctactttgc acagcctgaa tatgctgcat 960
 tctcgcggtt tctcgcgga agttttcggc atcctcgcgc ggcataatat ttcggtagac 1020
 ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaatccttg ataccaccgg ttcaacctcc 1080
 actggcgata cgttgctgac gcaatctctg ctgatggagc tttccgcact gtgtcgggtg 1140
 gaggtggaag aaggtctggc gctggtcgcg ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc 1200
 ggcgttgga aagaggtatt cggcgtactg gaaccgttca acattcgcac gatttgttat 1260
 ggcgcatcca gccataacct gtgcttctcg gtgcccggcg aagatgccga gcaggtgggtg 1320
 caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa 1350

<210> 4
 <211> 392
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 4

gatctcgtca atttttccct tttgtaattt tgtaatttat aatttacttt cctgtatgct 60
 tctaactctg tcgttttaaa attttaataa aatttcagta ggggcttgcc cctcctgtcc 120
 tataaaaaaa agttgacgtg aatagatttc attaagaggt tggatgtag tgggatgaca 180
 tgactattag taggacgaga tgatgtggaa agttagtggg agatgatatg gatagttttt 240
 gctttcatcg aaagggttga agttagtatg atgacatggc taatatagat acatagatat 300
 agactaccaa catggctgca tgccccaag ctctccact atatatatct ctggtagcac 360
 atcatcccaa ttcacaatgc ttacaaaaac cc 392

<210> 5
 <211> 903
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 5

ttatagaact ccagcttttt tcatgtcttc tcgcagagcc tcaagtctct gctcatttgg 60
 agccattatt ggaagcctag gatctcctac gttgatgcct tgcagacgca gagcagcttt 120
 tgccaagctg actccacca agcgaccctg ggcagctacc agcggtgata gtttggcggt 180
 gatctcctc gcacggacca ggtcgccttc ctcgaaactt gtgtacaact cccttaatgc 240
 tgtgggggct gcatgtccaa ttacggatat aaaacctgat ccgcccag caagccaaac 300

aaggtttagt gggcatcgc ctgaatacca ggcaagtccc gtttctttga tcaatgacgt 360
ggctgcaacc aggtcccctt tggcgtcttt gaccgcaaaa atcgtaggta attcactcag 420
gcgtctcatg gtatcagact caattggaat acctgacctt ccaggaatgt cgtagaggca 480
aattggcacc tctgttgctg ctgcgattgc cccgaagtgc gccagcaatc cctcctggct 540
cggcttactg taataaggag ttacgactaa aaggccgtct gcgccagcag aagcagcagc 600
ctccgcaagt tccacagatg tccgcgtggt attggttccg acaccggcga ttagtttcgc 660
cctatcccct acttcctcac gcacggcctt gagcagttct agtttctcag cggcggttgt 720
cgttggggat tcaccagtgg tgcccgcgag caccaaagaa tccaagcctt tatcgactag 780
ataagccgcg acctgcggcg cagcagctat atcgatgtct ccactttccg tgaatggagt 840
taccattgct actcccacgg tgccaaagtg ctctactccg gtcttagctg ttaaacctgt 900
gct 903

<210> 6
<211> 171
<212> DNA
<213> Zea mays

<400> 6
atggtttctgc cgacgaatct cctcccggcg cggaagatca cccctgtctc aaatggcggc 60
gcagcgacgg cgagcccctc ttctccctcg gtggccgcac ggccacggcg actcccttca 120
ggcctccaat ctgtgactgg tagagggaag gtttccttgg cagccatcac t 171

<210> 7
<211> 300
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 7
Ser Thr Gly Leu Thr Ala Lys Thr Gly Val Glu His Phe Gly Thr Val
1 5 10 15
Gly Val Ala Met Val Thr Pro Phe Thr Glu Ser Gly Asp Ile Asp Ile
20 25 30
Ala Ala Gly Arg Glu Val Ala Ala Tyr Leu Val Asp Lys Gly Leu Asp
35 40 45
Ser Leu Val Leu Ala Gly Thr Thr Gly Glu Ser Pro Thr Thr Thr Ala
50 55 60
Ala Glu Lys Leu Glu Leu Leu Lys Ala Val Arg Glu Glu Val Gly Asp
65 70 75 80
Arg Ala Lys Leu Ile Ala Gly Val Gly Thr Asn Asn Thr Arg Thr Ser
85 90 95
Val Glu Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ser Ala Gly Ala Asp Gly Leu Leu
100 105 110
Val Val Thr Pro Tyr Tyr Ser Lys Pro Ser Gln Glu Gly Leu Leu Ala
115 120 125

His Phe Gly Ala Ile Ala Ala Ala Thr Glu Val Pro Ile Cys Leu Tyr
 130 135 140
 Asp Ile Pro Gly Arg Ser Gly Ile Pro Ile Glu Ser Asp Thr Met Arg
 145 150 155 160
 Arg Leu Ser Glu Leu Pro Thr Ile Leu Ala Val Lys Asp Ala Lys Gly
 165 170 175
 Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Leu Ile Lys Glu Thr Gly Leu Ala Trp
 180 185 190
 Tyr Ser Gly Asp Asp Pro Leu Asn Leu Val Trp Leu Ala Leu Gly Gly
 195 200 205
 Ser Gly Phe Ile Ser Val Ile Gly His Ala Ala Pro Thr Ala Leu Arg
 210 215 220
 Glu Leu Tyr Thr Ser Phe Glu Glu Gly Asp Leu Val Arg Ala Arg Glu
 225 230 235 240
 Ile Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu Val Ala Ala Gln Gly Arg Leu Gly
 245 250 255
 Gly Val Ser Leu Ala Lys Ala Ala Ser Arg Leu Gln Gly Ile Asn Val
 260 265 270
 Gly Asp Pro Arg Leu Pro Ile Met Ala Pro Asn Glu Gln Glu Leu Glu
 275 280 285
 Ala Leu Arg Glu Asp Met Lys Lys Ala Gly Val Leu
 290 295 300

<210> 8
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 8

Met Ala Glu Ile Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp
 1 5 10 15
 Phe Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn
 20 25 30
 Val Arg Leu Val Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu
 35 40 45
 Val Ala Leu Ala Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu
 50 55 60
 Asp Ala Ile Arg Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr
 65 70 75 80
 Pro Asn Val Ile Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr
 85 90 95
 Val Leu Ala Glu Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp
 100 105 110
 Glu Leu Val Ser His Gly Glu Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu
 115 120 125
 Ile Leu Arg Glu Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys
 130 135 140

Val Met Arg Thr Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu
 165 170 175
 Gly Leu Val Ile Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg
 180 185 190
 Thr Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu
 195 200 205
 Ala Glu Ala Leu His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro
 210 215 220
 Gly Ile Tyr Thr Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile
 225 230 235 240
 Asp Glu Ile Ala Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala
 245 250 255
 Lys Val Leu His Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile
 260 265 270
 Pro Val Phe Val Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu
 275 280 285
 Val Cys Asn Lys Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu
 290 295 300
 Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His
 305 310 315 320
 Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn
 325 330 335
 Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr
 340 345 350
 Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln
 355 360 365
 Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu
 370 375 380
 Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys
 385 390 395 400
 Ala Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg
 405 410 415
 Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro
 420 425 430
 Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe
 435 440 445
 Glu

<210> 9
 <211> 1155
 <212> DNA
 <213> Zea mays
 <400> 9

```

ccgatttggc aagtgttcca gagcaaaagc tggaagctct cgtagtctga gcctctttgc 60
tgattcatac aagttatgac catctacatg gatcgctctca ccaagaaatt tgtagactgc 120
aggatttttc cctgaccgga gtgcaccagc tgggttccaa ctgaatttat aggcaagcgg 180
attgtttgct gcagctggag atggcaatcc accacagtaa gatgtaaag cctttatttt 240
tccctttcgt gcatgagctt catcaatcat cttcattgac atcaagtgat ctatgccagg 300
atctaggccc atttcacaaa gtatagttac acctgcatct ttggcagctt ggctcaagtt 360
tgacatggat tcatcaacat agcttgccgt taccatgtgc ttcttcaact ctatgcatac 420
tcctgcaatg gcagcatgaa aactagcagg cagcaagcta attacaacct caacctgaga 480
aacaagatct gaaaggcttc caatatcagc aacatcaagc tgggtagcag ttgtattttc 540
aataccatca actgtctctt ctgcatcttt ttgatacaaa gatgccacga taacatgaat 600
ttgatctgca tcatgggtcat caacaccata ggtacatatg tctgggtaag atgccagaaa 660
ctcagcagct ggccgacaga ctcttcacgc tccaaaccgg tgctgcctgc tagttttcat 720
gctgccattg caggagtatg catagagttg aagaagcaca tggtaacggc aagctatgtt 780
gatgaatcca tgtcaaactt gagccaagct gccaaagatg cagggtgaac tatactttgt 840
gaaatgggcc tagatcctgg catagatcac ttgatgtcaa tgaagatgat tgatgaagct 900
catgcacgaa agggaaaaat aaaggcattt acatcttact gtggtggatt gccatctcca 960
gctgcagcaa acaatccgct tgcctataaa ttcagttgga acccagctgg tgcactccgg 1020
tcagggaaaa atcctgcagt ctacaaattt cttggtgaga cgatccatgt agatgggtcat 1080
aacttgatg aatcagcaaa gaggtcaga ctacgagagc ttccagcttt tgctctggaa 1140
cacttgccaa atcgg 1155

```

```

<210>      10
<211>     1967
<212>      DNA
<213>     Sequência artificial

```

```

<220>
<223>     Molécula de DNA quimérico de um íntro de hsp70 de milho e uma
           molécula de supressão gênica de LKR/SDH

```

```

<400>      10

```

```

accgtcttcg gtacgcgctc actccgccct ctgcctttgt tactgccacg tttctctgaa 60
tgctctcttg tgtggtgatt gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt acactctgaa 120
atcggtttct gcctgtgctg attacttgcc gtcctttgta gcagcaaaat ataggacat 180
ggtagtacga aacgaagata gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta atttggtgct 240
tagcgggtatt tatttaagca catggttggtg ttatagggca cttggattca gaagtttgc 300
gttaatttag gcacaggctt catactacat gggtaacatg tatagggtatt catattatag 360
gcgatactat aataatttgt tcgtctgcag agcttattat ttgccaaaat tagatattcc 420
tattctgttt ttgtttgtgt gctgttaaat tggtgatccc gatttggtgaa gtgttccaga 480

```

gcaaaagctg gaagctctcg tagtctgagc ctctttgctg attcatacaa gttatgacca 540
 tctacatgga tcgtctcacc aagaaatttg tagactgcag gatttttccc tgaccggagt 600
 gcaccagctg ggttccaact gaatttatag gcaagcggat tgtttgctgc agctggagat 660
 ggcaatccac cacagtaaga tgtaaagcc tttatttttc ctttcgtgc atgagcttca 720
 tcaatcatct tcattgacat caagtgatct atgccaggat ctaggcccac ttcacaaagt 780
 atagttacac ctgcatcttt ggcagcttgg ctcaagtttg acatggattc atcaacatag 840
 cttgccgtta ccatgtgctt cttcaactct atgcatactc ctgcaatggc agcatgaaaa 900
 ctagcaggca gcaagctaata tacaacctca acctgagaaa caagatctga aaggcttcca 960
 atatcagcaa catcaagctg ggtagcagtt gtattttcaa taccatcaac tgtctcttct 1020
 gcactctttt gatacaaaga tgccacgata acatgaattt gatctgcac atgggtcatca 1080
 acaccatagg tacatatgtc tgggtaagat gccagaaact cagcagctgg ccgacagact 1140
 cttccagctc caaacgggtg ctgcctgcta gttttcatgc tgccattgca ggagtatgca 1200
 tagagttgaa gaagcacatg gtaacggcaa gctatgttga tgaatccatg tcaaacttga 1260
 gccaaagctg caaagatgca ggtgtaacta tacttttgta aatgggccta gatcctggca 1320
 tagatcactt gatgtcaatg aagatgattg atgaagctca tgcacgaaag ggaaaaataa 1380
 aggcatttac atcttactgt ggtggattgc catctccagc tgcagcaaac aatccgcttg 1440
 cctataaatt cagttggaac ccagctgggt cactccggtc agggaaaaat cctgcagtct 1500
 acaaatttct tggtgagacg atccatgtag atggtcataa cttgtatgaa tcagcaaaga 1560
 ggctcagact acgagagctt ccagcttttg ctctggaaca cttgccaaat cggaattaac 1620
 gcctgaagga ataaatataa atgacgaaat tttgatgttt atctctgctc ctttattgtg 1680
 accataagtc aagatcagat gcacttgttt taaatattgt tgtctgaaga aataagtact 1740
 gacagtattt tgatgcattg atctgcttgt ttgttgtaac aaaatttaaa aataaagagt 1800
 ttcttttttg ttgctctct tacctctga tggatctag tatctacaa ctgacactat 1860
 attgcttctc ttacatacg tatcttgctc gatgccttct ccctagtgtt gaccagtgtt 1920
 actcacatag tctttgctca tttcattgta atgcagatac caagcgg 1967

<210> 11
 <211> 1350
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <400> 11

atggcagaaa ttgttgtctc caaatttggc ggtaccagcg tagctgattt tgacgccatg 60
 aaccgcagcg ctgatattgt gctttctgat gccacgtgc gtttagttgt cctctcggtc 120
 tctgctggta tcaactatct gctggtcgct ttagctgaag gactggaacc tggcgagcga 180
 ttogaaaaac togacgctat ccgcaacatc cagtttgcca ttctggaacg tctgcgttac 240
 ccgaacgtta tccgtgaaga gattgaacgt ctgctggaga acattactgt tctggcagaa 300

gggcgggcgc tggcaacgtc tccggcgctg acagatgagc tggtcagcca cggcgagctg 360
 atgtcgaccc tgctgtttgt tgagatcctg cggaacgcg atgttcaggc acagtggttt 420
 gatgtacgta aagtgatgcg taccaacgac cgatttggtc gtgcagagcc agatatagcc 480
 gcgctggcgg aactggccgc gctgcagctg ctcccacgtc tcaatgaagg cttagtgtac 540
 acccagggat ttatcggtag cgaataaaa ggtcgtacaa cgacgcttgg ccgtggaggc 600
 agcgattata cggcagcctt gctggcggag gctttacacg catctcgtgt tgatatctgg 660
 accgacgtcc cgggcatcta caccaccgat ccacgcgtag tttccgcagc aaaacgcatt 720
 gatgaaatcg cgtttgccga agcggcagag atggcaactt ttggtgcaa agtactgcat 780
 cgggcaacgt tgctacccgc agtacgcagc gatatcccg tctttgtcgg ctccagcaaa 840
 gaccacgcg cagggtgtac gctggtgtgc aataaaactg aaaatccgc gctgttccgc 900
 gctctggcgc ttcgtcgcaa tcagactctg ctcaacttgc acagcctgaa tatgtgcat 960
 tctcgcggtt tcctcgcgga agttttcggc atcctcgcg gcataatat ttcggtagac 1020
 ttaatcacca cgtcagaagt gagcgtggca ttaatccttg ataccacgg ttcaacctcc 1080
 actggcgata cgttgctgac gcaatctctg ctgatggagc tttccgcact gtgtcgggtg 1140
 gaggtggaag aaggtctggc gctggtcgcg ttgattggca atgacctgtc aaaagcctgc 1200
 ggcgttgga aagaggtatt cggcgtagt gaaccgttca acattcgcat gatttggtat 1260
 ggcgcatcca gccataacct gtgcttcctg gtgcccggcg aagatgccga gcagggtggtg 1320
 caaaaactgc atagtaattt gtttgagtaa 1350

REIVINDICAÇÕES

1. Constructo de DNA que compreende um cassete de expressão vegetal heterólogo que codifica uma ácido dihidrodipicolínico sintase que é substancialmente resistente à inibição do "feedback" pela L-lisina livre; e
5 que compreende ainda uma molécula de DNA que é transcrita para produzir uma molécula de RNA que suprime uma lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase; em que cada uma das moléculas de DNA está ligada de forma operacional a um promotor intensificado nas sementes, em
10 que o promotor promove a transcrição das moléculas de DNA substancialmente no endosperma de uma semente.

2. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 1, que compreende um cassete de expressão adicional que compreende uma molécula de DNA que codifica uma aspartato quinase que é substancialmente resistente ao "feedback" pela L-lisina livre.

15 3. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 1, em que uma molécula de DNA que codifica um peptídeo sinal de trânsito para o plastídeo está ligada de forma operacional à molécula de DNA que codifica a ácido dihidrodipicolínico sintase.

20 4. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 2, em que uma molécula de DNA que codifica um peptídeo sinal de trânsito para o plastídeo está ligada de forma operacional à molécula de DNA que codifica a aspartato quinase.

25 5. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 1, em que a molécula de DNA que codifica uma ácido dihidrodipicolínico sintase é a SEQ ID NO: 1.

30 6. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 1, em que a molécula de DNA que é transcrita para produzir uma molécula de RNA que suprime a lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase é homóloga ou complementar à SEQ ID NO: 2 ou a uma parte da mesma suficiente para a supressão da desidrogenase.

7. Constructo de DNA de acordo com a reivindicação 2, em que a molécula de DNA que codifica uma aspartato quinase é a SEQ ID NO: 3.

8. Semente de milho que compreende o DNA nativo e um ou mais cassetes de expressão vegetal exógenos que compreendem uma molécula de DNA que codifica uma ácido dihidrodipicolínico sintase que é substancialmente resistente à inibição do "feedback" pela L-lisina livre, uma molécula de DNA que é transcrita para produzir uma molécula de RNA que suprime uma lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase e uma molécula de DNA que codifica uma aspartato quinase resistente ao "feedback" da lisina, as moléculas de DNA estando ligadas de forma operacional a uma ou mais moléculas de promotores que causam a transcrição de uma ou mais moléculas de RNA substancialmente no endosperma da semente de milho.

9. Semente de acordo com a reivindicação 8, em que o construto compreende ainda uma molécula de DNA que codifica uma 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintase.

10. Semente de acordo com a reivindicação 8, em que a molécula de DNA que codifica uma seqüência de DNA estrutural da ácido dihidrodipicolínico sintase é a SEQ ID NO: 1.

11. Semente de acordo com a reivindicação 8, em que a molécula de DNA que codifica uma aspartato quinase é a SEQ ID NO: 3.

12. Semente de acordo com a reivindicação 8, em que a molécula de DNA que é transcrita para produzir uma molécula de RNA que suprime uma lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase é a SEQ ID NO: 9.

13. Semente de acordo com a reivindicação 9, em que a dita 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintase é uma aroA:CP4 EPSPS.

14. Semente de acordo com a reivindicação 8, em que a molécula de DNA compreende ainda uma seqüência de DNA que codifica um peptídeo sinal de trânsito para o cloroplasto ligado de forma operacional à seqüência de DNA que codifica a ácido dihidrodipicolínico sintase ou a aspartato quinase.

15. Semente de acordo com a reivindicação 8, em que o promotor é selecionado do grupo que consiste do promotor B32 de *Zea mays*, da

gama coixina de *Zea mays* e L3 de *Zea mays*.

16. Semente de acordo com a reivindicação 8, que possui um teor de lisina maior que a semente de milho que não contém os cassetes de expressão vegetal exógenos.

5 17. Constructo de DNA que consiste do plasmídeo pMON93092 que compreende os cassetes de expressão vegetal que são depositados junto à ATCC como PTA-6733 ou o plasmídeo pMON93093 que compreende os cassetes de expressão vegetal que são depositados junto à ATCC como PTA-6734.

10 18. Semente de planta que compreende dentro de seu genoma pelo menos um cassete de expressão vegetal do plasmídeo pMON93092 ou do plasmídeo pMON93093.

15 19. Produto processado da semente como definido na reivindicação 18, em que o dito produto é um produto alimentício, uma farinha, uma farinha grossa ou uma composição de proteína parcialmente purificada.

20 20. Produto processado da semente como definida na reivindicação 18, que compreende fragmentos do DNA nativo e fragmentos dos cassetes de expressão vegetal exógenos.

25 21. Célula de milho que compreende um ou mais cassetes de expressão vegetal exógenos que compreendem uma molécula de DNA que codifica uma ácido dihidrodipicolínico sintase que é substancialmente resistente à inibição do "feedback" pela L-lisina livre, uma molécula de DNA que é transcrita para produzir uma molécula de RNA que suprime uma lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase e uma molécula de DNA que codifica uma aspartato quinase resistente ao "feedback" da lisina, as moléculas de DNA estando ligadas de forma operacional a uma ou mais moléculas promotoras que causam a transcrição de uma ou mais moléculas de RNA substancialmente no endosperma de uma semente de milho.

30 22. Célula de acordo com a reivindicação 21, em que o constructo compreende ainda uma molécula de DNA que codifica uma 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintase.

23. Célula de acordo com a reivindicação 21, em que a molécula

de DNA que codifica uma seqüência de DNA estrutural da ácido dihidrodipicolínico sintase é a SEQ ID NO: 1.

24. Célula de acordo com a reivindicação 21, em que a molécula de DNA que codifica uma aspartato quinase é a SEQ ID NO: 3.

5 25. Célula de acordo com a reivindicação 21, em que a molécula de DNA que é transcrita para produzir uma molécula de RNA que suprime uma lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase é a SEQ ID NO: 9 (a seqüência bfx).

10 26. Célula de acordo com a reivindicação 22, em que a dita 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintase é uma aroA:CP4 EPSPS.

15 27. Célula de acordo com a reivindicação 21, em que a molécula de DNA compreende ainda uma seqüência de DNA que codifica um peptídeo sinal de trânsito para cloroplasto ligado de forma operacional à seqüência de DNA que codifica a ácido dihidrodipicolínico sintase ou a aspartato quinase.

28. Célula de acordo com a reivindicação 21, em que o promotor é um promotor B32 de *Zea mays* ou da gama coixina de *Zea mays* ou L3 de *Zea mays*.

20 29. Célula de acordo com a reivindicação 21, que possui um teor de lisina maior que o da semente de milho que não contém os cassetes de expressão vegetal exógenos.

30. Célula vegetal que compreende dentro de seu genoma os cassetes de expressão vegetal do plasmídeo pMON93092 ou do plasmídeo pMOM93093.

25 31. Produto processado que contém células intactas ou rompidas como definidas na reivindicação 21, em que o produto é um produto alimentício, uma farinha grossa ou uma farinha.

32. Processo para a produção de grão que compreende as etapas de:

30 a) transformação de uma célula de uma variedade de planta com os cassetes de expressão vegetal plasmídeo pMON93092 ou pMON93093;

b) regeneração da dita célula em uma planta fértil que possui os cassetes de expressão em seu genoma; e

c) coleta da semente da dita planta,

em que a semente possui um teor de lisina maior que o da semente da mesma variedade não transformada com o dito constructo.

33. Processo para a obtenção de semente que compreende as etapas de:

a) seleção de uma primeira e uma segunda plantas parentais cada uma compreendendo um ou dois cassetes de expressão vegetal heterólogos selecionados do grupo que consiste de (i) um cassete que compreende uma molécula de DNA que codifica uma ácido dihidrodipicolínico sintase que é substancialmente resistente à inibição do "feedback" pela L-lisina livre, (ii) um cassete que compreende uma molécula de DNA que é transcrita para produzir uma molécula de RNA que suprime uma lisina cetoglutarato redutase/sacaropina desidrogenase e (iii) um cassete que compreende uma molécula de DNA que codifica uma aspartato quinase que é resistente à inibição do "feedback" pela lisina; as moléculas de DNA em cada um dos cassetes estando ligadas de forma operacional com uma molécula promotora que causa a transcrição de uma molécula de RNA substancialmente no endosperma de uma semente de milho, de forma que cada uma das parentais possui pelo menos um dos cassetes de expressão, nenhuma das parentais possui todos os três cassetes de expressão e as parentais sejam diferentes uma da outra em relação aos cassetes de expressão;

b) cruzamento das plantas parentais selecionadas; e

c) coleta da semente da progênie do dito cruzamento.

34. Processo de fornecimento de nutrição a um ser humano ou a um animal inferior que compreende a alimentação do ser humano ou do a-

nimal inferior com uma dieta que compreende uma semente de milho com alto teor de lisina ou um produto processado partindo da mesma, que compreende os cassetes de expressão vegetal de pMON93092 ou pMON93093.

5 35. Processo de fornecimento de nutrição a um ser humano ou a um animal inferior que compreende a alimentação do ser humano ou do animal inferior com uma dieta que compreende uma semente de milho com alto teor de lisina ou um produto processado partindo da mesma, que compreende fragmentos do DNA nativo provenientes da semente e fragmentos dos cassetes de expressão vegetal de pMON93092 ou pMON93093.

10 36. Produto processado da semente que compreende as etapas de:

- a) transformação de uma célula de uma variedade de planta com os cassetes de expressão vegetal plasmídeo pMON93092 ou pMON93093;
- 15 b) regeneração da dita célula em uma planta fértil que possui os cassetes de expressão em seu genoma;
- c) coleta da semente da dita planta, e
- d) processamento da dita semente em um produto alimentício para animais ou uma farinha grossa ou uma farinha ou um
- 20 óleo;

em que a semente possui um teor maior de lisina que a semente da mesma variedade não transformada com o dito constructo.

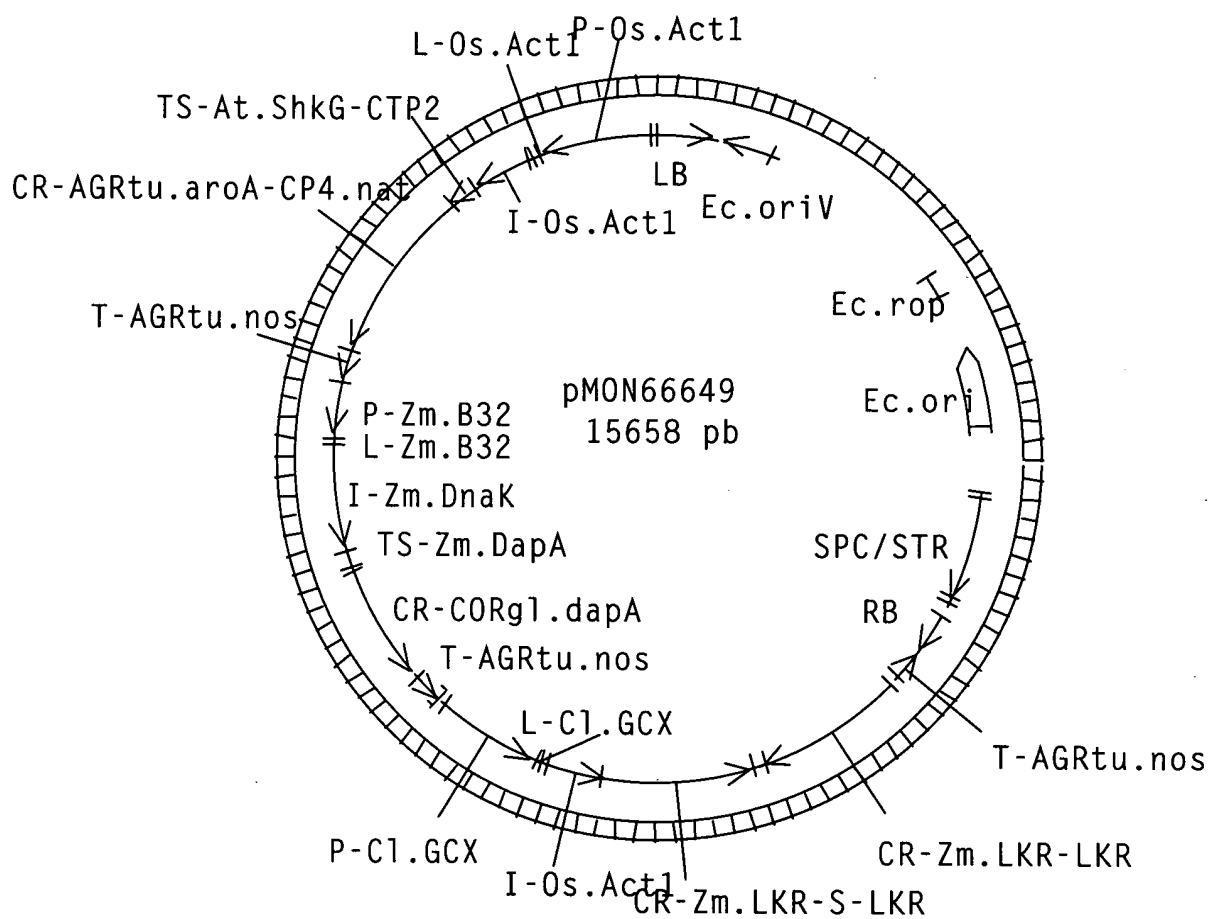


FIG. 1

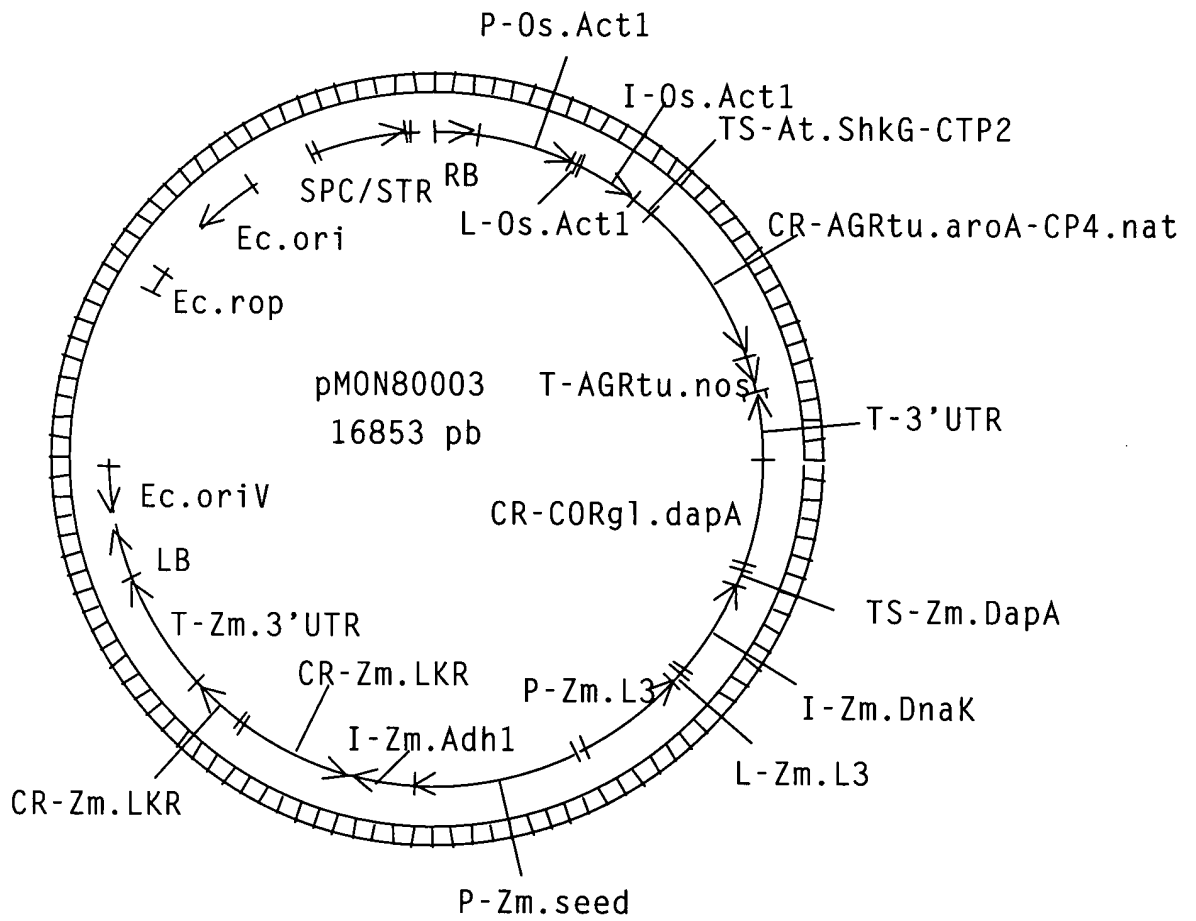


FIG. 2

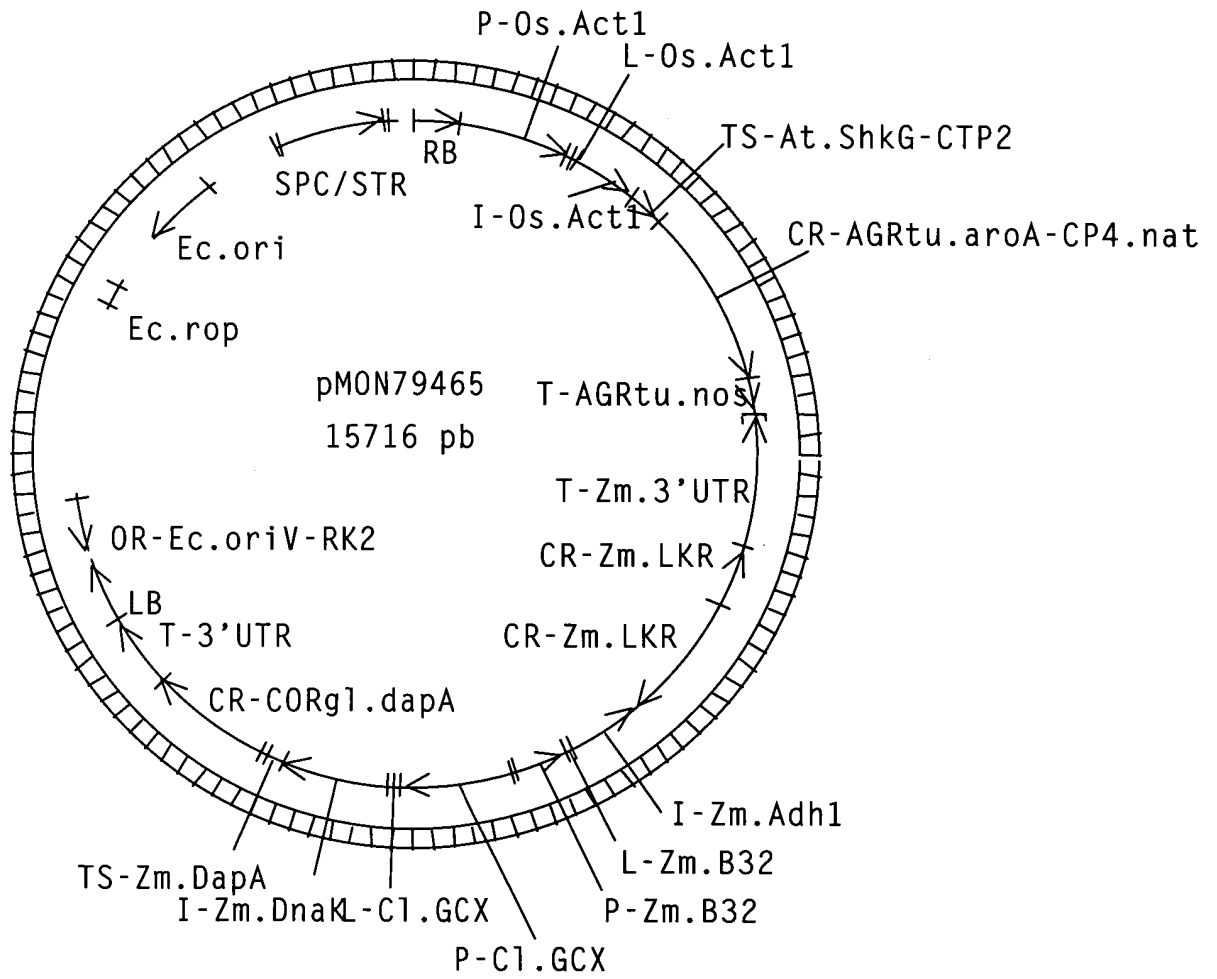


FIG. 3

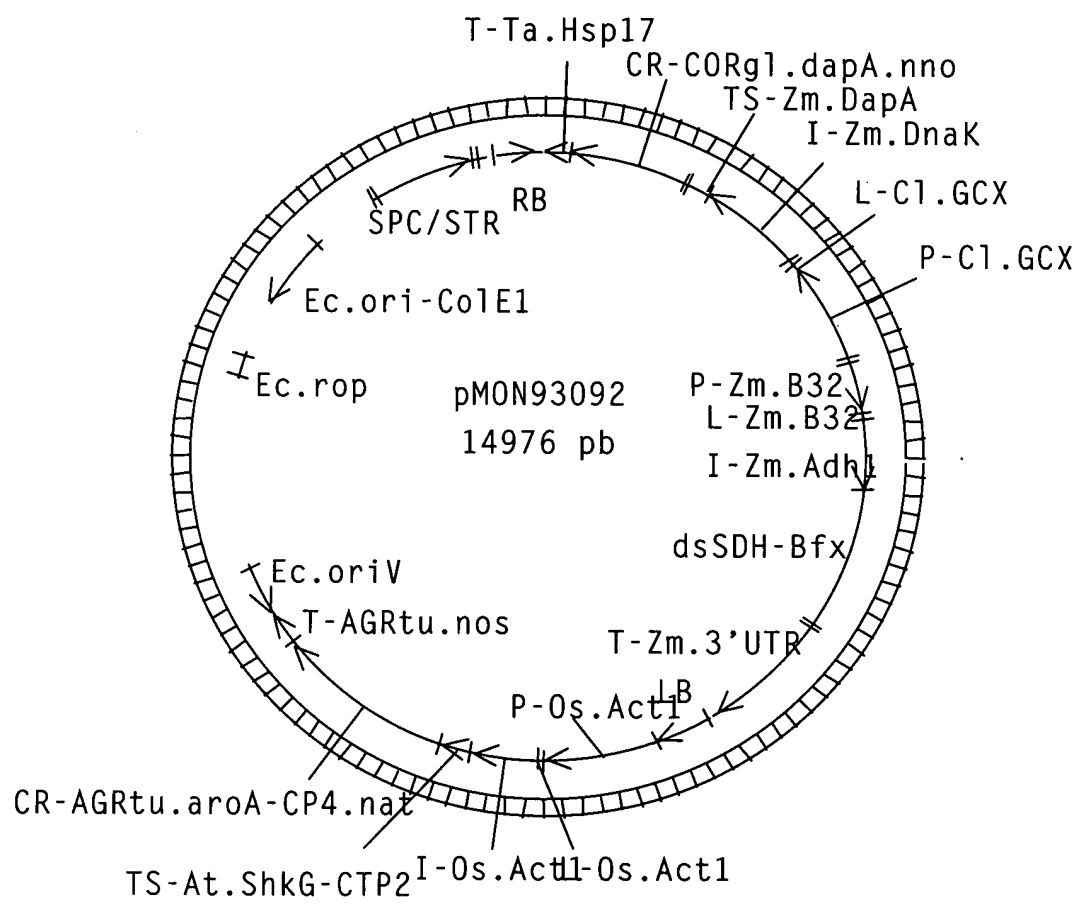


FIG. 4

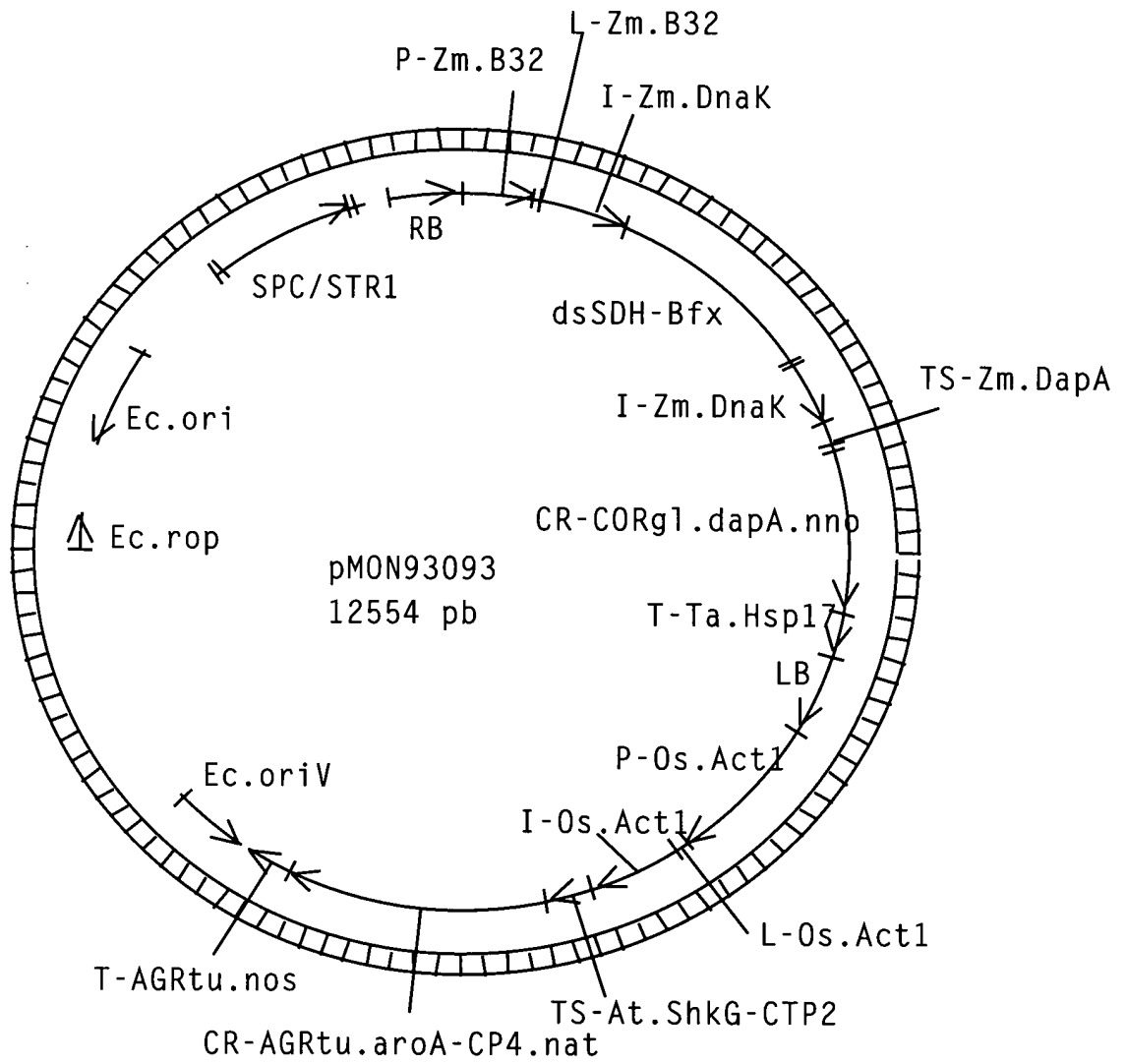


FIG. 5

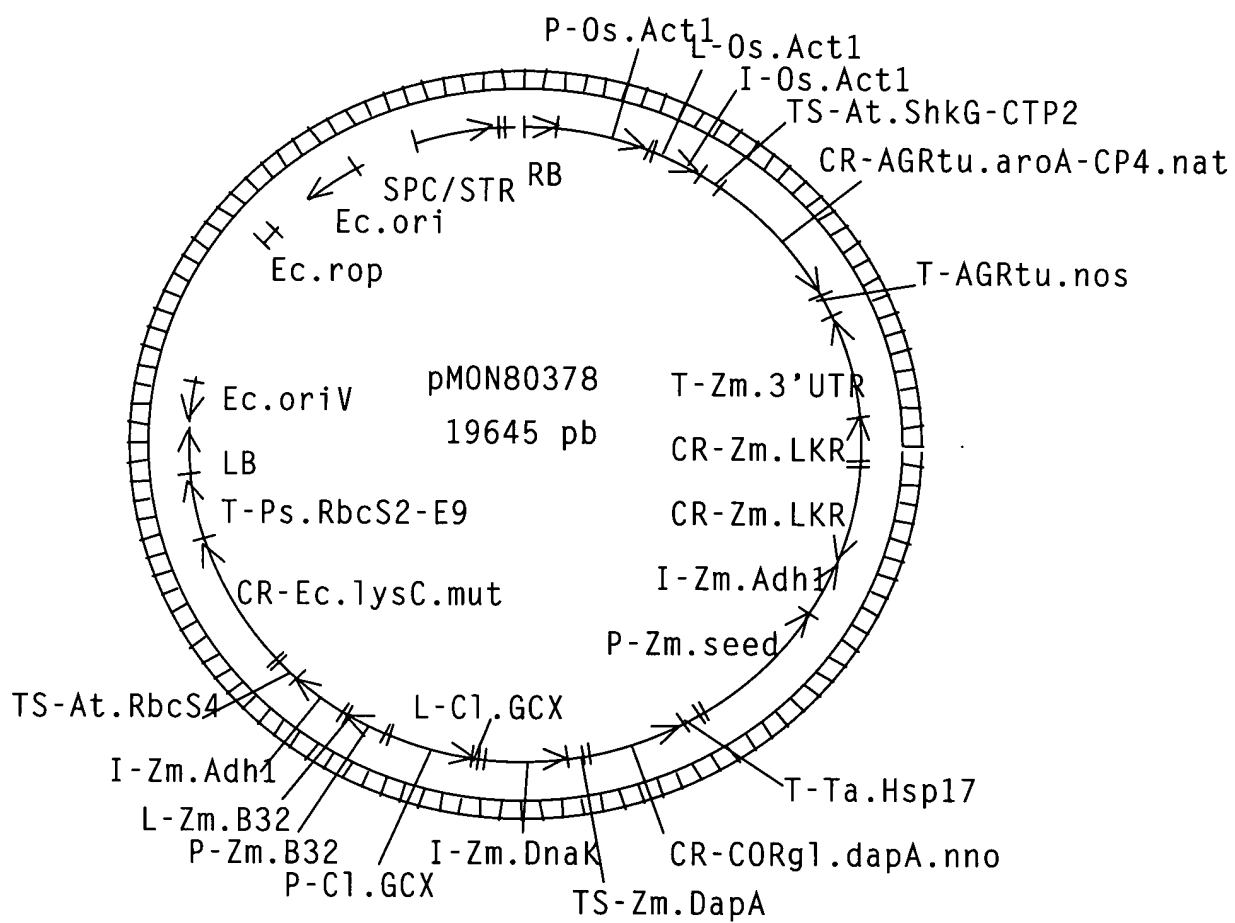


FIG. 6

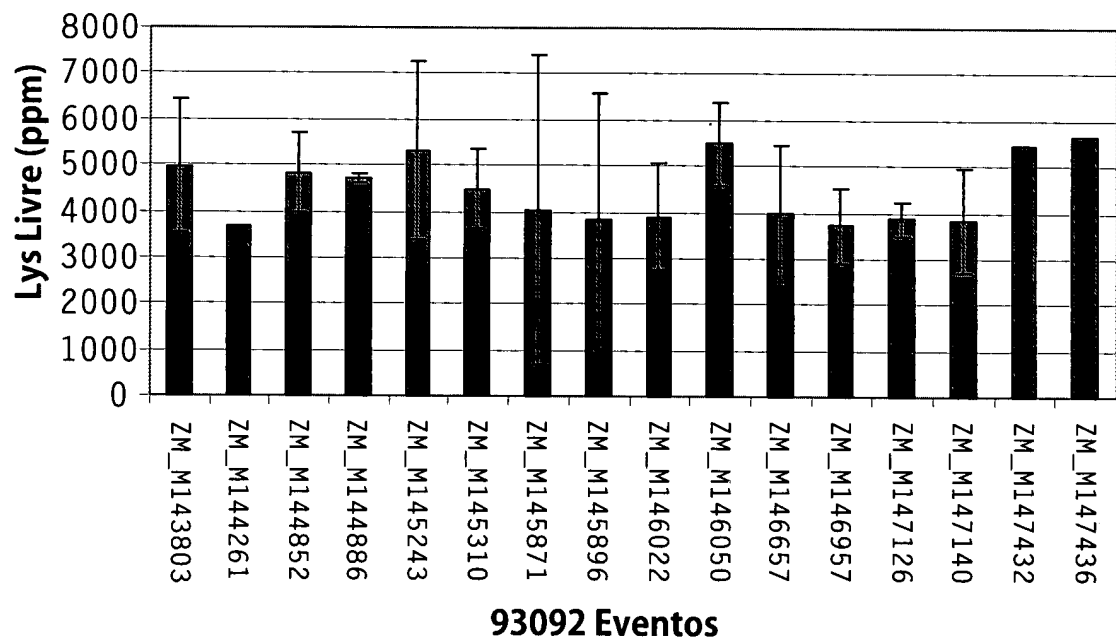
Tero de lisina livre (ppm) em 93092 grãos de R2

FIG. 7

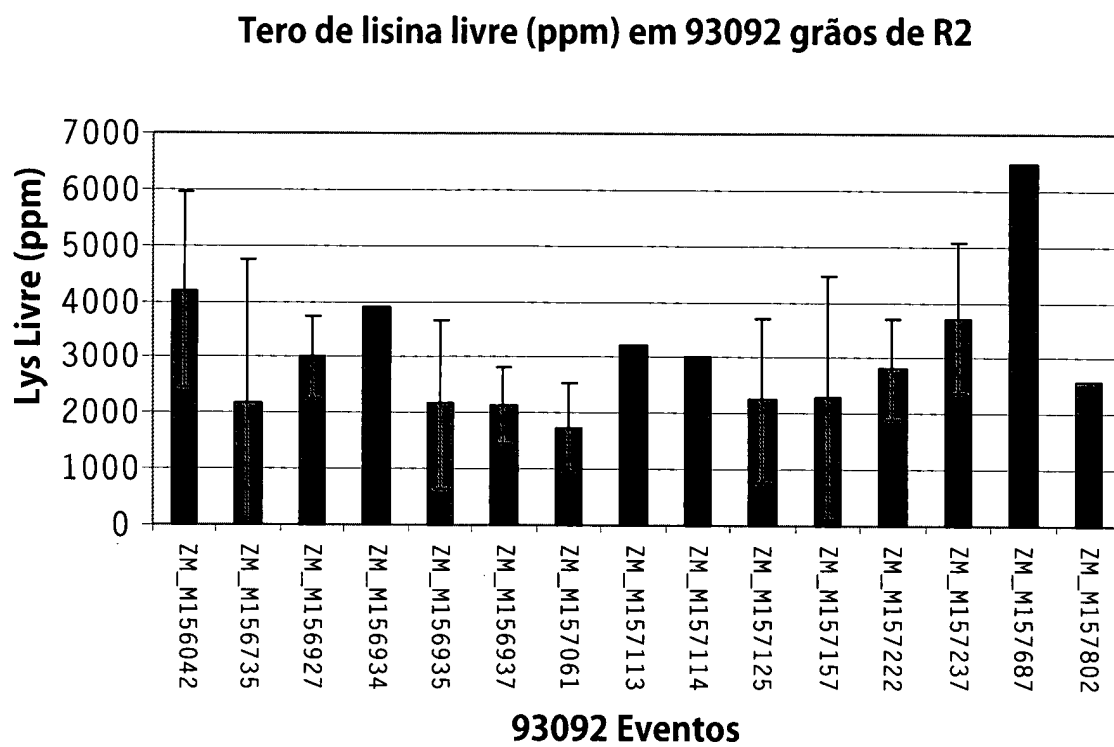


FIG. 8

RESUMO

Patente de Invenção: **"SEMENTE DE PLANTA TRANSGÊNICA COM MAIOR TEOR DE LISINA"**.

5 A presente invenção refere-se a plantas transgênicas que possuem um novo constructo de DNA exógena que expressa uma ácido dihidrodipicolínico sintase e uma molécula de supressão gênica para a lisina cetoglutarato redutase, cuja atividade resulta em um maior teor de lisina em uma semente de planta.