



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0810973-7 B1

(22) Data do Depósito: 23/05/2008

(45) Data de Concessão: 02/07/2024

(54) Título: MÉTODOS PARA AUMENTAR O TEOR DE ÁCIDO GRAXO TOTAL DE UMA SEMENTE DE SOJA, MÉTODO PARA AUMENTAR O TEOR DE ÁCIDO GRAXO TOTAL DE UMA SEMENTE DE MILHO, POLINUCLEOTÍDEO RECOMBINANTE, CONSTRUÇÃO DE DNA RECOMBINANTE, MÉTODO PARA AUMENTAR O TEOR TOTAL DE ÁCIDO GRAXO DE UMA SEMENTE DE PLANTA DE SEMENTE OLEAGINOSA, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA SEMENTE DE SOJA OU DE MILHO E MÉTODO PARA PRODUZIR UM PRODUTO

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

(30) Prioridade Unionista: 13/12/2007 US 61/013,406; 24/05/2007 US 60/939,872.

(73) Titular(es): CORTEVA AGRISCIENCE LLC.

(72) Inventor(es): KNUT MEYER; WILLIAM D. H ITS; NARENDRA S. YADAV; HOWARD G. DAMUDE.

(86) Pedido PCT: PCT US2008064621 de 23/05/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/147935 de 04/12/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/11/2009

(57) Resumo: MÉTODOS PARA AUMENTAR O TEOR DE ÁCIDO GRAXO TOTAL DE UMA SEMENTE DE SOJA, MÉTODO PARA AUMENTAR O TEOR DE ÁCIDO GRAXO TOTAL DE UMA SEMENTE DE MILHO, POLINUCLEOTÍDEO RECOMBINANTE, CONSTRUÇÃO DE DNA RECOMBINANTE, MÉTODO PARA AUMENTAR O TEOR TOTAL DE ÁCIDO GRAXO DE UMA SEMENTE DE PLANTA DE SEMENTE OLEAGINOSA, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA SEMENTE DE SOJA OU DE MILHO E MÉTODO PARA PRODUZIR UM PRODUTO. A presente invenção descreve sementes de soja transgênica que possuem teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% e perfis de ácidos graxos alterados quando comparado com o teor de ácido graxo total de sementes de soja segregantes nulas não transgênicas. A presente invenção utiliza genes DGAT de *Yarrowia lipolytica* para atingir o aumento dos lipídios de armazenagem de sementes

**“MÉTODOS PARA AUMENTAR O TEOR DE ÁCIDO GRAXO TOTAL DE
UMA SEMENTE DE SOJA, MÉTODO PARA AUMENTAR O TEOR DE ÁCIDO
GRAXO TOTAL DE UMA SEMENTE DE MILHO, POLINUCLEOTÍDEO
RECOMBINANTE, CONSTRUÇÃO DE DNA RECOMBINANTE, MÉTODO
PARA AUMENTAR O TEOR TOTAL DE ÁCIDO GRAXO DE UMA SEMENTE
DE PLANTA DE SEMENTE OLEAGINOSA, MÉTODO PARA PRODUZIR
UMA SEMENTE DE SOJA OU DE MILHO E MÉTODO PARA PRODUZIR UM
PRODUTO”**

REFERÊNCIA CRUZADA AO PEDIDO DE PATENTE RELACIONADO

[001] O presente pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório US 60/939872, depositado em 24 de maio de 2007, e do Pedido Provisório Norte-Americano nº 61/013406, depositado em treze de dezembro de 2007, cujas revelações são integralmente incorporadas ao presente.

CAMPO DA INVENÇÃO

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

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] Os lipídios vegetais possuem uma série de usos industriais e nutricionais e são fundamentais para a função de membranas vegetais e adaptação climática. Esses lipídios representam um amplo conjunto de estruturas químicas e essas estruturas determinam as propriedades fisiológicas e industriais do lipídio. Muitas dessas estruturas resultam direta ou indiretamente de processos metabólicos que alteram o grau de insaturação do lipídio. Diferentes regimes metabólicos em plantas diferentes produzem esses lipídios alterados e a domesticação de espécies vegetais exóticas ou a

modificação de espécies agronomicamente adaptadas normalmente é necessária para produzir quantidades economicamente grandes do lipídio desejado.

[004] Existem sérias limitações para o uso de mutagênese para alterar a composição e o teor de ácidos graxos. Seleções raramente descobrirão mutações que (a) resultem em um fenótipo dominante (“ganho de função”); (b) encontrem-se em genes que sejam essenciais para o crescimento vegetal; e (c) encontrem-se em uma enzima que não seja limitadora da velocidade e que seja codificada por mais de um gene. Em casos em que fenótipos desejados são disponíveis em linhagens de milho mutantes, a sua introgressão em linhagens de elite por meio de métodos tradicionais de cultivo é cara e lenta, pois as composições de óleo desejadas provavelmente são o resultado de diversos genes recessivos.

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

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

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

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

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

[009] Foram identificadas duas famílias diferentes de proteínas DGAT. A primeira família de proteínas DGAT ("DGAT1") refere-se à acil-

coenzima A: aciltransferase de colesterol (“ACAT”) e foi descrita nas Patentes US 6.100.077 e US 6.344.548. Uma segunda família de proteínas DGAT (“DGAT2”) não está relacionada com a família de DGAT1 e é descrita no documento WO 2004/011671, publicada em cinco de fevereiro de 2004. Outras referências a genes DGAT e seu uso em plantas incluem os documentos WO 2004/011.671, WO 1998/055.631 e WO 2000/001.713, bem como a Patente US 20030115632.

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

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

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

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

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

- (a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma construção recombinante que contém pelo menos uma sequência de DGAT; e
- (b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% quando comparado com o teor de ácido graxo total de uma semente de soja

segregante nula não transgênica.

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

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

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

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

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

[017] Em uma realização adicional, a presente invenção refere-se à soja transgênica que contém teor de ácido graxo total aumentado em pelo menos 10% e pelo menos qualquer um dentre (i) teor de ácido oleico aumentado em pelo menos 25%; (ii) teor de ácido linolênico reduzido em pelo menos 25%; (iii) teor de ácido linoleico reduzido em pelo menos 4%; (iv) teor de ácido palmítico reduzido em pelo menos 8%; e (v) teor de ácido esteárico aumentado em pelo menos 14% quando comparado com o teor de ácido graxo total e o teor de ácido oleico, ácido linolênico, ácido linoleico, ácido palmítico ou

ácido esteárico, respectivamente, de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

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

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

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

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

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

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

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

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

(b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a)

que contém(êm) um teor de ácido graxo total aumentado em pelo menos 10% e teor de ácido linoleico reduzido em pelo menos 4% quando comparado com o teor de ácido graxo total e o teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

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

- (a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma construção recombinante que contém pelo menos uma sequência de DGAT; e
- (b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor de ácido graxo total aumentado em pelo menos 10% e teor de ácido linolênico reduzido em pelo menos 8% quando comparado com o teor de ácido graxo total e o teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

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

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

[023] Qualquer das sementes transgênicas de acordo com a presente invenção pode compreender uma construção recombinante que contém pelo menos uma sequência de DGAT que pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em DGAT1, DGAT2 e DGAT1 em combinação com

DGAT2. Além disso, a sequência de DGAT pode ser uma sequência de *Yarrowia*.

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

[025] Também se encontram dentro do escopo da presente invenção versões que sofreram mutação de DGATs de *Yarrowia* que retêm a função. Exemplos específicos incluem, mas sem limitar-se a um polinucleotídeo recombinante que compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que possui atividade de diacilglicerol aciltransferase, em que o polipeptídeo é descrito em SEQ ID N° 83, 88 ou 93. O complemento da sequência de nucleotídeos, construções de DNA recombinantes que compreendem a sequência de nucleotídeos e células que incorporam as construções de DNA recombinantes também se encontram dentro do escopo da presente invenção. Plantas oleaginosas são úteis para compreender as construções recombinantes.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS E LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

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

[027] A Figura 1 fornece mapas de plasmídeos para pFBAIn-YLDGAT1, para pFBAIn-YLDGAT2 e para pFBAIn-MOD1.

[028] A Figura 2 fornece mapas de plasmídeos para KS352 e KS332.

[029] A Figura 3 fornece mapas de plasmídeos para KS349, KS362 e KS364.

[030] A Figura 4 fornece uma forte correlação ($R^2 \geq 0,59$) entre o teor de ácido oleico e o teor de ácido graxo total esterificado para embriões

somáticos gerados com KS349.

[031] A Figura 5 fornece uma forte correlação ($R^2 \geq 0,67$) entre o teor de ácido oleico e o teor de ácido graxo esterificado total para embriões somáticos gerados com KS362 isoladamente ou em combinação com KS349 bem como com KS364.

[032] A Figura 6 fornece uma correlação ($R^2 \geq 0,45$) entre o teor de ácido oleico e o teor de óleo para semente de soja transgênica (geração T1) gerada por meio de cotransformação de plasmídeos KS349 e KS362.

[033] A Figura 7 fornece teor de óleo e peso de semente T1 gerada por meio de cotransformação de plasmídeos KS349 e KS362 (A) e KS362 isoladamente (B).

[034] A Figura 8 fornece resultados de hibridização de manchas de DNA genômico. DNA genômico foi isolado a partir de grãos de soja transgênicos obtidos dos eventos AFS4818.1.2, AFS4818.1.3, AFS4818.1.5, AFS4818.2.6, AFS4818.1.9 (vide o Exemplo 6). O DNA foi digerido com EcoRI e HindIII, vaza sobre um gel e é manchado em filtros de nylon (AFS4818.1.2 linhas 1 e 2, AFS4818.1.3 linhas 3 e 4, AFS4818.1.5 linhas 5 e 6, AFS4818.2.6 linhas 7 e 8, AFS4818.1.9 linhas 9 e 10 e linhas 11 e 12 são DNA do tipo selvagem não transgênico também digerido com EcoRI e HindIII). Sondas de hibridização foram uma sonda específica de DGAT1 de *Yarrowia* para a mancha superior (A) e a mancha inferior foi sondada com uma sonda específica de DGAT2 de *Yarrowia*.

[035] A Figura 9 fornece resultados de hibridização de manchas de DNA genômico.

[036] As manchas são similares às descritas na Figura 8, exceto pelo fato de que todos os DNAs foram digeridos com BstXI e a mancha foi sondada com uma sonda específica de DGAT2 de *Yarrowia*.

[037] As descrições de sequências reduzem a Listagem de

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

RESUMO DE PROTEÍNAS E Nº DE SEQ ID DE ÁCIDOS NUCLEICOS:

Descrição e abreviação	SEQ ID Nº de ácido nucleico	SEQ ID Nº de proteína
Gene DGAT1 de <i>Yarrowia lipolytica</i>	1 (1581 bp)	
Plasmídeo pYDA1	2 (8325 bp)	
Plasmídeo py75	3 (7518 bp)	
Plasmídeo pY75 YLDGAT1: YLDGAT1 inserido em pY75	4 (9109)	
Plasmídeo pRS425	5 (6849 bp)	
Gene DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i>	9 (1545 bp)	10 (514 aa)
Plasmídeo pY75 YLDGAT2, pY75 com YL DGAT2 inserido	11 (9070 bp)	
Variante de gene DGAT1 de <i>Yarrowia lipolytica</i> com locais NcoI e NotI adicionados	16 (1603 bp)	
Variante de gene DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> com locais NcoI e NotI adicionados	17 (1567 bp)	

Descrição e abreviação	SEQ ID Nº de ácido nucleico	SEQ ID Nº de proteína
Plasmídeo pFBAIN-MOD-1	18 (6991 bp)	
Plasmídeo pFBAIN-YLDGAT, pFBAIN com YL DGAT1 inserido	19 (8568 bp)	
Plasmídeo pFBAIN-YLDGAT2	20 (8532 bp)	
Plasmídeo pKS123	21 (7049 bp)	
cal a24-4	22 (1098 bp)	
Plasmídeo pKR53B	25 (8138 bp)	
Plasmídeo pKR72	26 (7085 bp)	
Plasmídeo pKR85	27 (7085 bp)	
Plasmídeo pPCR85	30 (4827 bp)	
Plasmídeo pKR91	31 (15114 bp)	
Plasmídeo pKR92	32 (13268 bp)	
Plasmídeo pKR92 YL DGAT2, pKR92 com o gene YL DGAT2 inserido	33 (19604 bp)	

Descrição e abreviação	SEQ ID Nº de ácido nucleico	SEQ ID Nº de proteína
Plasmídeo pKR92 YL DGAT1 YL DGAT2	34 (20082 bp)	
Gene glicinina 1 (GY1) de soja (Genbank X15121)	35 (3527 bp)	
Promotor GY1 de soja	36 (690 bp)	
Plasmídeo pZBL 114	39 (6660 bp)	
Gene GY1 (glicinina 1) GM de soja	40 (1437 bp)	
Gene BHL8 (alta lisina de cevada) sintético	41 (204 bp)	
Produto de fusão GY1-BHL8	42 (1701 bp)	
Plasmídeo pZBL133	43 (6493 bp)	
Plasmídeo pKS238	44 (6472 bp)	
Plasmídeo pKS240	45 (6259 bp)	
Plasmídeo pKS120	46 (5267 bp)	
Plasmídeo pKS242	47 (8643 bp)	

Descrição e abreviação	SEQ ID Nº de ácido nucleico	SEQ ID Nº de proteína
Plasmídeo pKS349	48 (8720 bp)	
Plasmídeo pKS121/BS	49 (5280 bp)	
Plasmídeo pVermelho DS em pKS121/BS	50 (5968 bp)	
Plasmídeo pKS332	51 (10058 bp)	
Plasmídeo pKS362 que compreende DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> do tipo selvagem dirigido por um promotor de betaconglucina	52 (11611 bp)	
Promotor de soja GM P34	53 (1422 bp)	
Plasmídeo pZBL115	56 (7466 bp)	
Plasmídeo pJS89	57 (7841 bp)	
Sequência de codificação do gene delta-6 dessaturase de <i>Mortierella alpina</i>	58 (1390 bp)	
Plasmídeo pJS93	59 (9223 bp)	
Plasmídeo pKS127	60 (7472 bp)	

Descrição e abreviação	SEQ ID Nº de ácido nucleico	SEQ ID Nº de proteína
Plasmídeo pKS343	61 (7847 bp)	
Plasmídeo pKS352	62 (10866 bp)	
Plasmídeo pKS364	63 (12055 bp)	
Códon do gene DGAT1 de <i>Yarrowia lipolytica</i> otimizado para soja	64 (1581 bp)	65 (526 aa)
Códon do gene DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> otimizado para soja	66 (1545 bp)	67 (514 aa)
Plasmídeo pKR1234	68 (8638 bp)	
Plasmídeo ppPSgly32	71 (3673 bp)	
Plasmídeo pKR264	72 (4171 bp)	
Plasmídeo pKR1212	73 (6130 bp)	
Plasmídeo pKR1235	74 (5764 bp)	
Plasmídeo pKR1236 que compreende DGAT1 e DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i>	75 (11693 bp)	
Plasmídeo pKR1254 que compreende DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> do tipo selvagem	78 (5079 bp)	

Descrição e abreviação	SEQ ID Nº de ácido nucleico	SEQ ID Nº de proteína
Plasmídeo pKR1254_Y326F, pKR1254 que compreende DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> Y326F mutante	81 (5079 bp)	
DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> que compreende o códon 326 que sofreu mutação de Tyr para Phe	82 (1545 bp)	83 (514 aa)
Plasmídeo pKR1254_Y326L, pKR1254 que compreende DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> Y326L mutante	86 (5079 bp)	
DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> que compreende códon 326 que sofreu mutação de Tyr para Leu	87 (1545 bp)	88 (514 aa)
Plasmídeo pKR1254_R327K, pKR1254 que compreende DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> R327K mutante	91 (5079 bp)	
DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> que compreende o códon 327 que sofreu mutação de Arg para Lys	92 (1545 bp)	93 (514 aa)
Vetor de expressão de levedura de plasmídeo pY191 que compreende DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> do tipo selvagem	94 (9074 bp)	
Vetor de expressão de levedura de plasmídeo pY191 que compreende DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> Y326F mutante	95 (9074 bp)	
Vetor de expressão de levedura de plasmídeo pY193 que compreende DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> Y326L mutante	96 (9074 bp)	

Descrição e abreviação	SEQ ID Nº de ácido nucleico	SEQ ID Nº de proteína
Vetor de expressão de levedura de plasmídeo pY194 que compreende DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> R327K mutante	97 (9074 bp)	
Vetor de expressão de soja de plasmídeo pKR1256 que compreende DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> do tipo selvagem	98 (8641 bp)	
Vetor de expressão de soja de plasmídeo pKR1277 que compreende DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> Y326F mutante	99 (8641 bp)	
Vetor de expressão de soja de plasmídeo pKR1278 que compreende DGAT2 de <i>Yarrowia lipolytica</i> Y326L mutante	100 (8641 bp)	
Plasmídeo pKS392 que compreende códon DGAT1 de <i>Yarrowia lipolytica</i> otimizado para soja dirigido por promotor b-conglicinina	101 (11647 bp)	
Plasmídeo pKS393 que compreende códon DGAT1 de <i>Yarrowia lipolytica</i> otimizado para soja dirigido por promotor b-com	102 (11611 bp)	
Plasmídeo pKS391 que compreende códon DGAT1 de <i>Yarrowia lipolytica</i> do tipo selvagem dirigido por promotor b-con	103 (11649 bp)	
Plasmídeo pKR278	104 (5303)	

Descrição e abreviação	SEQ ID Nº de ácido nucleico	SEQ ID Nº de proteína
Plasmídeo pKR1274	105 (8358)	
Gene tioesterase2 de soja	106 (1251)	
Plasmídeo pTC4	107 (9592)	
Plasmídeo pKR1258	112 (4738)	
Gene Fad2-1 de soja	113 (1164)	
Plasmídeo pBS43	114 (10303)	
Plasmídeo PCRblunt-Fad2-1	119 (4584)	
Plasmídeo pKR1259	120 (5797)	
Plasmídeo pKR1261	121 (7590)	
Plasmídeo pKR123R	122 (4993)	
Plasmídeo pKR1266	123 (9036)	
Plasmídeo pKR1267	124 (11615)	

Descrição e abreviação	SEQ ID Nº de ácido nucleico	SEQ ID Nº de proteína
Plasmídeo pKR457	125 (5252)	
Plasmídeo pKR1264	126 (9295)	
Plasmídeo pKR1277	127 (2577)	
Plasmídeo pKR1269	128 (219)	

[038] SEQ ID Nº 7 e 8 correspondem aos primers de PCR oYLDGAT2-1 (SEQ ID Nº 7) e oYLDGAT2-2 (SEQ ID Nº 8), utilizados para amplificar o gene diacilglicerol aciltransferase 2 de *Yarrowia lipolytica* (YL DGAT2) a partir de um lisado de levedura (para detalhes, vide o Exemplo 1).

[039] SEQ ID Nº 12 a 15 corresponde a primers de oligonucleotídeos utilizados para amplificar as regiões de codificação de YL DGAT1 (YDGAT1-F e YDGAT1-R; SEQ ID Nº 12 e 13, respectivamente) e YL DGAT2 (YDGAT2-F e YDGAT2-R, SEQ ID Nº 14 e 15, respectivamente) de DNA genômico de *Yarrowia lipolytica*.

[040] SEQ ID Nº 23 (oCal-15) e SEQ ID Nº 24 (oCal-6) correspondem a primers de oligonucleotídeos utilizados para amplificar fragmento de DNA cal a24-4 (SEQ ID Nº 22) de modelo plasmídeo CalFad2-2 descrito no documento WO 02/008269.

[041] SEQ ID Nº 28 (oKR85-1) e SEQ ID Nº 29 (oKR85-2) correspondem a primers utilizados para amplificar o promotor de betaconglucininina-(local de clonagem NotI)-região de término 3' de faseolina de

plasmídeo pKR85 (SEQ ID Nº 27).

[042] SEQ ID Nº 37 (oGy1-1) e SEQ ID Nº 38 (oGy1-2) correspondem a primers utilizados para amplificar o promotor glicinina 1 de soja (SEQ ID Nº 36) e incorporar locais BamHI e NcoI sobre as extremidades 5' e 3', respectivamente.

[043] SEQ ID Nº 54 (oP34-1) e SEQ ID Nº 55 (oP34-2) correspondem a primers utilizados para amplificar o promotor P34 de soja (SEQ ID Nº 53) e que incorporam os locais BamHI e NotI nas extremidades 5' e 3', respectivamente.

[044] SEQ ID Nº 69 (oSGly-2) e SEQ ID Nº 70 (oSGly-3) correspondem a primers utilizados para amplificar o promotor GY1 de glicinina.

[045] SEQ ID Nº 76 (oYDG2-1) e SEQ ID Nº 77 (oYDG2-2) correspondem a primers utilizados para amplificar DGAT2 de *Yarrowia* (SEQ ID Nº 10) que foi incorporado em seguida em pKR1254 (SEQ ID Nº 78).

[046] SEQ ID Nº 79 (YID2_Y326F-5) e SEQ ID Nº 80 (YID2_Y326F-3) correspondem a primers utilizados para realizar mutação do aminoácido na posição 326 de DGAT2 de *Yarrowia* (SEQ ID Nº 10) de tirosina para fenilalanina.

[047] SEQ ID Nº 84 (YID2_Y326L-5) e SEQ ID Nº 85 (YID2_Y326L-3) correspondem a primers utilizados para realizar mutação do aminoácido na posição 326 de DGAT2 de *Yarrowia* (SEQ ID Nº 10) de tirosina para leucina.

[048] SEQ ID Nº 89 (YID2_R327K-5) e SEQ ID Nº 90 (YID2_R327K-3) correspondem a primers utilizados para realizar mutação do aminoácido na posição 327 de DGAT2 de *Yarrowia* (SEQ ID Nº 10) de arginina para lisina.

[049] SEQ ID Nº 108 a 111 (GmTE2 5-1, GmTE2 3-1, GmTE2 5-2 e GmTE2 3-2, respectivamente) correspondem a primers utilizados para amplificar o gene tioesterase 2 de soja.

[050] SEQ ID Nº 115 a 118 (GmFad2-1 5-1, GmFad2-1 3-1, GmFad2-1 5-2 e GmFad2-1 3-2, respectivamente) correspondem a primers utilizados para amplificar o gene dessaturase de ácido graxo 2-1 de soja.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[051] A descrição de cada referência descrita no presente é integralmente incorporada ao presente como referência.

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

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

“Quadro de leitura aberta” é abreviado ORF.

“Reação em cadeia de polimerase” é abreviada PCR.

“Coleção Norte-Americana de Cultivo de Tipos” é abreviada ATCC.

“Acil-CoA:esterol-aciltransferase” é abreviada ARE2.

“Fosfolipídio:diacilglicerol aciltransferase” é abreviada PDAT.

“Diacilglicerol aciltransferase” é abreviada DAG AT ou DGAT.

“Diacilglicerol” é abreviado DAG.

“Triacilgliceróis” são abreviados TAGs.

“Coenzima A” é abreviada CoA.

[054] A expressão “ácidos graxos” designa ácidos alifáticos de cadeia longa (ácidos alcanoicos) com comprimento de cadeia variável, de cerca de C₁₂ a C₂₂ (embora sejam conhecidos ácidos com comprimento de cadeia mais longo e mais curto). Os comprimentos de cadeia predominantes

são de C₁₆ a C₂₂. A estrutura de um ácido graxo é representado por um sistema de notação simples “X:Y”, em que X é o número total de átomos de carbono (C) no ácido graxo específico e Y é o número de ligações duplas.

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

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

[057] “Corpos de lipídios” designam gotículas de lipídios que normalmente são delimitadas por proteínas específicas e uma monocamada de fosfolipídios. Estas organelas são locais em que a maior parte dos organismos transporta ou armazena lipídios neutros. Acredita-se que corpos de lipídios surjam de microdomínios do retículo endoplasmático que contêm enzimas de

biossíntese de TAG; e a sua síntese e o seu tamanho aparentemente são controlados por componentes de proteínas específicos.

[058] “Lipídios neutros” designam os lipídios comumente encontrados em células em corpos de lipídios como óleos e gorduras de armazenagem e são chamados desta forma porque, sob pH celular, os lipídios não contêm grupos carregados. Geralmente, eles são completamente não polares sem afinidade para água. Lipídios neutros geralmente designam mono, di e/ou triésteres de glicerol com ácidos graxos, também denominados monoacilglicerol, diacilglicerol ou TAG, respectivamente (ou, coletivamente, acilgliceróis). Uma reação de hidrólise deve ocorrer para liberar ácidos graxos livres de acilgliceróis.

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

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

[061] O termo “PDAT” designa uma enzima de fosfolipídio:

diacilglicerol aciltransferase (EC 2.3.1.158). Esta enzima é responsável pela transferência de um grupo acila da posição *sn*-2 de um fosfolipídio para a posição *sn*-3 de 1,2-diacilglicerol, de forma a resultar em lisofosfolipídio e TAG (envolvido desta forma na etapa terminal de biossíntese de TAG). Esta enzima difere de DGAT (EC 2.3.1.20) por meio da síntese de TAG por meio de um mecanismo independente de acil-CoA.

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

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

[064] As expressões “subfragmento que é funcionalmente equivalente” e “subfragmento funcionalmente equivalente” são utilizadas de forma intercambiável no presente. Estas expressões designam uma parte ou

subsequência de um fragmento de ácido nucleico isolado no qual a capacidade de alterar a expressão genética ou produzir um certo fenótipo é retida quer o fragmento ou subfragmento codifique ou não uma enzima ativa. O fragmento ou subfragmento pode ser utilizado, por exemplo, no projeto de genes quiméricos para produzir o fenótipo desejado em uma planta transformada. Genes quiméricos podem ser projetados para uso em supressão ligando-se um fragmento de ácido nucleico ou seu subfragmento, codifique ou não uma enzima ativa, na orientação com ou sem sentido com relação a uma sequência promotora vegetal.

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

[066] As expressões “homologia”, “homólogo”, “substancialmente similar” e “substancialmente correspondente” são utilizadas de forma intercambiável no presente. Elas designam fragmentos de ácido nucleico em que alterações em um ou mais bases de nucleotídeos não afetam a capacidade do fragmento de ácido nucleico de mediar a expressão genética ou produzir um certo fenótipo. Estas expressões também designam modificações dos fragmentos de ácido nucleico de acordo com a presente invenção tais como exclusão ou inserção de um ou mais nucleotídeos que não alterem

substancialmente as propriedades funcionais do fragmento de ácido nucleico resultante com relação ao fragmento não modificado inicial. Compreende-se, portanto, como apreciarão os técnicos no assunto, que a presente invenção engloba mais que os exemplos de sequência específicos.

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

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

[069] A expressão “condições estringentes” ou “condições de

hibridização estrigente” inclui referência a condições sob as quais uma sonda hibridizar-se-á seletivamente na sua sequência alvo. Condições estridentes são dependentes de sequência e serão diferentes em circunstâncias diferentes. Controlando-se a estridência das condições de hibridização e/ou lavagem, podem ser identificadas sequências alvo que são 100% complementares à sonda (sondagem homóloga). Alternativamente, condições de estridência podem ser ajustadas para permitir alguma falta de coincidência em sequências tais que sejam detectados graus mais baixos de similaridade (sondagem heteróloga). Geralmente, uma sonda possui comprimento de menos de cerca de mil nucleotídeos, opcionalmente menos de quinhentos nucleotídeos de comprimento.

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

[071] A especificidade é tipicamente a função de lavagens pós-

hibridização, em que os fatores críticos são a resistência iônica e a temperatura da solução de lavagem final. Para DNA e híbridos de DNA, a T_m pode ser calculada de forma aproximada a partir da equação de Meinkoth *et al.*, *Anal. Biochem.* 138: 267-284 (1984): $T_m = 81,5\text{ }^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$; em que M é a molaridade de cátions monovalentes, %GC é o percentual de nucleotídeos de guanosina e citosina no DNA, % form é o percentual de formamida na solução de hibridização e L é o comprimento do híbrido em pares de bases. A T_m é a temperatura (sob resistência iônica e pH definido) em que 50% de uma sequência alvo complementar hibridizam-se em uma sonda perfeitamente coincidente. A T_m é reduzida em cerca de 1 $^{\circ}\text{C}$ para cada 1% de falta de coincidência; desta forma, T_m e condições de hibridização e/ou lavagem podem ser ajustadas por hibridização em sequências com a identidade desejada. Caso se deseje sequências com $\geq 90\%$ de identidade, por exemplo, a T_m pode ser reduzida em 10 $^{\circ}\text{C}$. Geralmente, condições estridentes são selecionadas como sendo cerca de 5 $^{\circ}\text{C}$ mais baixas que o ponto de fusão térmica (T_m) para a sequência específica e seu complemento em pH e resistência iônica definida. Condições severamente estridentes podem utilizar, entretanto, uma hibridização e/ou lavagem sob temperatura 1, 2, 3 ou 4 $^{\circ}\text{C}$ mais baixa que o ponto de fusão térmica (T_m); condições moderadamente estridentes podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 6, 7, 8, 9 ou 10 $^{\circ}\text{C}$ abaixo do ponto de fusão térmica (T_m); condições de baixa estringência podem utilizar uma hibridização e/ou lavagem a 11, 12, 13, 14, 15 ou 20 $^{\circ}\text{C}$ abaixo do ponto de fusão térmica (T_m). Utilizando a equação, composições de hibridização e lavagem e T_m desejadas, os técnicos comuns no assunto compreenderão que variações na estringência de soluções de hibridização e/ou lavagem são descritas inerentemente. Caso o grau de falta de coincidência desejado resulte em uma T_m de menos de 45 $^{\circ}\text{C}$ (solução aquosa) ou 32 $^{\circ}\text{C}$ (solução de formamida), prefere-se aumentar a concentração

de SSC de forma que possa ser utilizada uma temperatura mais alta. Um extenso guia de hibridização de ácidos nucleicos é encontrado em Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2, *Overview of Principles of Hybridization and the Strategy of Nucleic Acid Probe Assays*, Elsevier, Nova Iorque (1993); e *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2, Ausubel *et al.*, eds., Greene Publishing e Wiley-Interscience, Nova Iorque (1995). Condições de hibridização e/ou lavagem podem ser aplicadas por pelo menos dez, trinta, sessenta, noventa, 120 ou 240 minutos.

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

[073] Desta forma, “percentual de identidade de sequências” designa o valor determinado por meio da comparação de duas sequências alinhadas de forma ideal ao longo de uma janela de comparação, em que a parte da sequência de polinucleotídeos ou polipeptídeos na janela de comparação pode compreender adições ou exclusões (ou seja, espaços) quando comparado com a sequência de referência (que não compreende adições nem exclusões) para alinhamento ideal das duas sequências. O percentual é calculado determinando-se o número de posições em que o resíduo de aminoácidos ou bases de ácidos nucleicos idênticos ocorre nas duas sequências para gerar o número de posições coincidentes, dividindo-se o número de posições coincidentes pelo número total de posições na janela de comparação e multiplicando-se os resultados por cem para gerar o percentual de identidade de sequências. Exemplos úteis de percentuais de identidades de sequências incluem, mas sem limitar-se a 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%,

80%, 85%, 90%, 95% ou qualquer percentual inteiro de 50% a 100%. Estas identidades podem ser determinadas utilizando qualquer um dos programas descritos no presente.

[074] Alinhamentos de sequências e cálculos de percentual de identidade ou similaridade podem ser determinados utilizando uma série de métodos de comparação projetados para detectar sequências homólogas que incluem, mas sem limitações, o programa MegAlign® da suíte de computação bioinformática LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison WI). Dentro do contexto do presente pedido, compreender-se-á que, ao utilizar-se software de análise de sequências para análise, os resultados da análise serão baseados nos “valores padrão” do programa indicado, a menos que especificado em contrário. Da forma utilizada no presente, “valores padrão” indicará qualquer conjunto de valores ou parâmetros carregados originalmente com o software quando inicializados pela primeira vez.

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

das sequências utilizando o programa Clustal V, é possível obter um “percentual de identidade” observando-se a tabela “distâncias de sequências” no mesmo programa.

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

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

[078] “Gene” indica fragmento de ácido nucleico que expressa uma proteína específica, que inclui sequências reguladoras anteriores (sequências não codificadoras 5’) e posteriores (sequências não codificadoras 3’) à sequência de codificação. “Gene nativo” indica gene encontrado na natureza com as suas próprias sequências reguladoras. Gene “quimérico” designa qualquer gene que não seja um gene nativo, que compreende sequências reguladoras e de codificação que não são encontradas juntas na natureza. Consequentemente, um gene quimérico pode compreender sequências reguladoras e sequências de codificação que são derivadas de

diferentes fontes, ou sequências reguladoras e sequências de codificação derivadas da mesma fonte, mas dispostas de uma forma diferente da encontrada na natureza. Gene “exógeno” indica um gene normalmente não encontrado no organismo hospedeiro, mas que é introduzido no organismo hospedeiro por meio de transferência genética. Os genes exógenos podem compreender genes nativos inseridos em um organismo não nativo ou genes quiméricos. “Transgene” é um gene que foi introduzido no genoma por meio de um procedimento de transformação.

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

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

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

[082] “Sequência de codificação” indica uma sequência de DNA que codifica uma sequência de aminoácidos específica. “Sequências reguladoras” indicam sequências de nucleotídeos localizadas acima (sequências não codificadoras 5’), na própria ou abaixo (sequências não codificadoras 3’) de sequência de codificação e que influenciam a transcrição, estabilidade ou processamento de RNA ou tradução da sequência de codificação associada. As sequências reguladoras podem incluir, mas sem

limitar-se a promotores, sequências líderes de tradução, íntrons, sequências de reconhecimento de poliadenilação, locais de processamento de RNA, locais de ligação efetores e estruturas de circuito e haste.

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

[084] “Sequência líder de tradução” designa uma sequência de polinucleotídeos localizada entre a sequência promotora de um gene e a

sequência de codificação. A sequência líder de tradução está presente no mRNA totalmente processado acima no fluxo da sequência de início de tradução. A sequência líder de tradução pode afetar o processamento do transcrito primário em mRNA, estabilidade de mRNA ou eficiência de tradução. Foram descritos exemplos de sequências líderes de tradução (Turner, R. e Foster, G. D., *Mol. Biotechnol.* 3: 225-236 (1995)).

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

[086] “Transcrito de RNA” designa o produto resultante da transcrição catalisada por polimerase de RNA de uma sequência de DNA. Quando o transcrito de RNA for uma cópia complementar perfeita da sequência de DNA, ele é denominado transcrito primário. Um transcrito de RNA é denominado RNA maduro quando for uma sequência de RNA derivada do processamento pós-transcricional do transcrito primário. “RNA mensageiro” ou “mRNA” designa o RNA que não contém íntrons e que pode ser traduzido em proteína pela célula. “cDNA” designa um DNA que é complementar a um modelo de mRNA e sintetizado a partir dele utilizando a enzima transcriptase reversa. O cDNA pode ser de fita única ou convertido em forma de fita dupla utilizando o fragmento Klenow de polimerase I de DNA. RNA “com sentido” designa transcrito de RNA que inclui o mRNA e pode ser traduzido em proteína em uma célula ou *in vitro*. “RNA sem sentido” designa um transcrito de RNA

que é complementar a mRNA ou um transcrito primário alvo, no todo ou em parte, e que bloqueia a expressão de um gene alvo (Patente US 5.107.065). A complementaridade de um RNA sem sentido pode dar-se com qualquer parte do transcrito genético específico, ou seja, na sequência não codificadora 5', sequência não codificadora 3', íntrons ou na sequência de codificação. "RNA funcional" designa RNA sem sentido, RNA de ribozima ou outro RNA que pode não ser traduzido, mas que ainda tenha efeito sobre processos celulares. As expressões "complemento" e "complemento reverso" são utilizadas de forma intercambiável no presente com relação a transcritos de mRNA e destinam-se a definir o RNA sem sentido da mensagem.

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

[088] As técnicas padrão de DNA recombinante e clonagem molecular utilizadas no presente são bem conhecidas no estado da técnica e são descritas de forma mais completa em Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY (1989). Os métodos de

transformação são bem conhecidos dos técnicos no assunto e são descritos acima.

[089] “PCR” ou “reação em cadeia de polimerase” é uma técnica de síntese de grandes quantidades de segmentos de DNA específicos e consiste em uma série de ciclos repetitivos (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk CT). Tipicamente, o DNA de fita dupla é desnaturado por calor, os dois primers complementares às fronteiras 3’ do segmento desejado são combinados sob baixa temperatura e estendidos em seguida sob temperatura intermediária. Um conjunto destas três etapas consecutivas é denominado “ciclo”.

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

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

exógeno e elementos adicionais ao gene exógeno que permitem expressão aprimorada daquele gene em um hospedeiro exógeno (ou seja, em um fragmento de ácido nucleico discreto para o qual pode ser movida uma sequência ou fragmento de ácido nucleico).

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

Northern de expressão de mRNA, análise de imunomanchas de expressão de proteínas ou análise fenotípica, entre outras.

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

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

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

[096] “Transformação estável” designa a transferência de um

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

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

[098] “Inibição sem sentido” designa a produção de transcritos de RNA sem sentido capazes de suprimir a expressão da proteína alvo. “Cossupressão” designa a produção de transcritos de RNA com sentido

capazes de suprimir a expressão de genes endógenos ou exógenos idênticos ou substancialmente similares (Patente US 5.231.020). Construções de cossupressão em plantas foram projetadas anteriormente concentrando-se na sobreexpressão de uma sequência de ácidos nucleicos que possui homologia para um mRNA endógeno, na orientação com sentido, o que resulta na redução de todo o RNA que possui homologia para a sequência sobreexpressa (Vaucheret *et al.*, *Plant J.* 16: 651-659 (1998); Gura, *Nature* 404: 804-808 (2000)). A eficiência geral deste fenômeno é baixa e a extensão da redução de RNA é amplamente variável. Trabalhos mais recentes descreveram o uso de estruturas de “grampo de cabelo” que incorporam, no todo ou em parte, uma sequência de codificação de mRNA em uma orientação complementar que resulta em uma potencial estrutura de “haste e circuito” para o RNA expresso (documento WO 99/53050, publicado em 21 de outubro de 1999; WO 02/00904, publicado em 3 de janeiro de 2002). Isso aumenta a frequência de cossupressão nas plantas transgênicas recuperadas. Uma outra variação descreve o uso de sequências virais vegetais para dirigir a supressão ou “silenciamento” de sequências de codificação de mRNA próximas (documento WO 98/36083, publicada em vinte de agosto de 1998). Esses dois fenômenos de cossupressão não foram elucidados mecanicamente, embora evidências genéticas tenham começado a desemaranhar esta complexa situação (Elmayan *et al.*, *Plant Cell* 10: 1747-1757 (1998)).

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

girassol (*Helianthus sp.*).

[0100] Dentro de micro-organismos oleaginosos, o teor de TAG ou óleo celular geralmente segue uma curva sigmóide, em que a concentração de lipídio aumenta até atingir o máximo na fase logarítmica posterior ou estacionária inicial e, em seguida, é gradualmente reduzida durante as fases estacionária posterior e de morte (Yongmanitchai e Ward, *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 419-25 (1991)).

[0101] A expressão “levedura oleaginosa” designa os micro-organismos classificados como leveduras fabricantes de óleo. Não é incomum que micro-organismos oleaginosos acumulem mais de cerca de 25% do seu peso de células secas na forma de óleo. Exemplos de leveduras oleaginosas incluem, mas sem limitar-se de nenhuma forma aos gêneros a seguir: *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Lipomyces*.

[0102] O termo “planta” designa plantas inteiras, órgãos de plantas, tecidos de plantas, sementes, células de plantas, sementes e sua prole. As células de plantas incluem, sem limitações, células de sementes, cultivos em suspensão, embriões, regiões meristemáticas, tecido de calo, folhas, raízes, brotos, gametófitos, esporófitos, pólen e microesporos.

[0103] “Prole” compreende qualquer geração subsequente de uma planta.

[0104] “Semente de soja segregante nula não transgênica” designa uma semente ou planta quase isogênica que não contém o transgene e/ou uma planta parental utilizada no processo de transformação para obter o evento transgênico. Segregantes nulos podem ser plantas ou sementes que não contenham a característica transgênica devido à segregação genética normal durante a propagação das plantas transgênicas heterozigóticas.

[0105] “Semente” é a cariopse do milho, que consiste em um

embrião maduro e endosperma, que são produtos de fertilização dupla. O termo “milho” representa qualquer variedade, cultivo ou população de *Zea mays* L.

[0106] “Grão” compreende sementes de milho maduras produzidas por plantadores comerciais para uso em fazenda ou para venda a clientes, em ambos os casos, para fins diferentes de cultivo ou reprodução da espécie. A “semente” é a semente de milho madura produzida para fins de propagação da espécie e para venda a plantadores comerciais. Da forma utilizada no presente, os termos sementes e grãos podem ser utilizados de forma intercambiável. O “embrião” ou também denominado “gérmén” é uma planta esporofítica jovem, antes do início de um período de rápido crescimento (germinação de sementes). O embrião (gérmén) de milho contém a ampla maioria do óleo encontrado na semente. A estrutura de embrião no grão de cereal inclui o eixo embriônico e o escutelo. O “escutelo” é o cotilédone isolado de um embrião de grão de cereal, especializado para absorção do endosperma. A “aleurona” é um material proteináceo, normalmente na forma de pequenos grânulos, que ocorre na camada celular mais externa do endosperma de milho e outros grãos.

[0107] A presente invenção refere-se a uma semente de soja transgênica que contém teor de ácido graxo total aumentado em pelo menos 10% quando comparado com o teor de ácido graxo total de uma semente de soja segregante nula não transgênica. Compreende-se que qualquer aumento mensurável do teor de ácido graxo total de uma transgênica sobre uma segregante nula não transgênica seria útil. Esses aumentos do teor de ácido graxo total incluiriam, mas sem limitar-se a pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% ou 20%.

[0108] Uma oleaginosa transgênica de acordo com a presente invenção pode compreender uma construção recombinante que contém pelo

menos uma sequência de DGAT. Essa sequência de DGAT pode ser selecionada a partir do grupo que consiste em DGAT1, DGAT2 e DGAT1 em combinação com DGAT2. Além disso, pelo menos uma sequência de DGAT pode ser de *Yarrowia*. Exemplos de sequências de DGAT apropriadas que podem ser utilizadas para a prática da presente invenção são discutidos nos Exemplos abaixo. Podem ser mencionados SEQ ID Nº 1, 9, 64, 66, 82, 87 e 92 da presente invenção. Os técnicos no assunto apreciarão que a presente invenção inclui, mas sem limitações, as sequências de DGAT descritas no presente.

[0109] Esse promotor de construção recombinante compreenderia diferentes componentes, tais como um promotor que é uma sequência de DNA que dirige a maquinaria celular de uma planta para produzir RNA a partir da sequência de codificação contígua abaixo no fluxo (3') do promotor. A região promotora influencia a velocidade, etapa de desenvolvimento e tipo de célula em que é elaborado o transcrito de RNA do gene. O transcrito de RNA é processado para produzir mRNA que serve de modelo de tradução da sequência de RNA na sequência de aminoácidos do polipeptídeo codificado. A sequência líder não traduzida 5' é uma região do mRNA acima no fluxo da região de codificação de proteína que pode desempenhar um papel no início e tradução do mRNA. O sinal de poliadenilação e término de transcrição 3' é uma região não traduzida abaixo no fluxo da região de codificação de proteínas que funciona na célula da planta para causar o término do transcrito de mRNA e a adição de nucleotídeos de poliadenilato à extremidade 3' do RNA.

[0110] A origem do promotor selecionado para dirigir a expressão da sequência de codificação de DGAT não é importante, desde que possua atividade de transcrição suficiente para realizar a presente invenção por meio de expressão de mRNA traduzível para os fragmentos de ácido nucleico desejados no tecido hospedeiro desejado no momento certo. Promotores

heterólogos ou não heterólogos (ou seja, endógenos) podem ser utilizados para a prática da presente invenção. Promotores apropriados incluem, por exemplo, mas sem limitações: a subunidade prime alfa de promotor beta conglicinina, o promotor inibidor de tripsina Kunitz 3, o promotor de anexina, o promotor de glicinina Gy1, a subunidade beta de promotor beta conglicinina, o promotor de P34/Gly Bd m 30K, o promotor de albumina, o promotor Leg A1 e o promotor Leg A2.

[0111] O promotor de anexina, ou P34, é descrito no documento WO 2004/071178 (publicada em 26 de agosto de 2004). O nível de atividade do promotor de anexina é comparável com o de muitos promotores fortes conhecidos, tais como: (1) o promotor CaMV 35S (Atanassova *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 37: 275-285 (1998); Battraw e Hall, *Plant Mol. Biol.* 15: 527-538 (1990); Holtorf *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 29: 637-646 (1995); Jefferson *et al.*, *EMBO J.* 6: 3901-3907 (1987); Wilmink *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 28: 949-955 (1995)); (2) os promotores de oleosina de *Arabidopsis* (Plant *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 25: 193-205 (1994); Li, dissertação de Ph.D na Universidade A&M do Texas, págs. 107-128 (1997)); (3) os promotores de proteína de extensão de ubiquitina de *Arabidopsis* (Callis *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265 (21): 12486-93 (1990)); (4) um promotor de gene de ubiquitina de tomate (Rollfinke *et al.*, *Gene* 211 (2): 267-76 (1998)); (5) um promotor de proteína de choque de calor de soja (Schoffl *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 217 (2-3): 246-53 (1989)); e (6) um promotor de gene de histona H3 de milho (Atanassova *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 37 (2): 275-85 (1989)).

[0112] Uma outra característica útil do promotor de anexina é o seu perfil de expressão em sementes em desenvolvimento. O promotor de anexina é mais ativo em sementes em desenvolvimento em estágios iniciais (antes de dez dias após a polinização) e é em grande parte ocioso em estágios posteriores. O perfil de expressão do promotor de anexina é diferente de diversos promotores específicos de sementes, tais como promotores de

proteína de armazenagem de sementes, que frequentemente fornecem atividade mais alta em estágios posteriores de desenvolvimento (Chen *et al.*, *Dev. Genet.* 10: 112-122 (1989); Ellerstrom *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 32: 1019-1027 (1996); Keddie *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 24: 327-340 (1994); Plant *et al.* (acima); Li (acima)). O promotor de anexina possui um perfil de expressão mais convencional, mas permanece distinto de outros promotores específicos de sementes conhecidos. Desta forma, o promotor de anexina será um candidato muito atraente quando se desejar a sobreexpressão ou supressão de um gene em embriões em um estágio de desenvolvimento inicial. Pode ser desejável, por exemplo, sobreexpressar um desenvolvimento de embrião inicial regulador de genes ou um gene envolvido no metabolismo antes do amadurecimento de sementes.

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

[0114] Os métodos de clonagem molecular e DNA recombinante padrão utilizados no presente são bem conhecidos no estado da técnica e descritos mais completamente em Sambrook, J. *et al.* em *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1989 (a seguir, "Sambrook *et al.*, 1989") ou Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. e Struhl, K., Eds.; em *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons: Nova Iorque, 1990 (a seguir, "Ausubel *et al.*, 1990").

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

- (a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma

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

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

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

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

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

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

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

[0121] A expressão “órgão de planta” designa tecido de planta ou

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

[0122] Métodos de transformação de dicotiledôneas (principalmente utilizando *Agrobacterium tumefaciens*) e obtenção de plantas transgênicas foram publicados, entre outros, para: algodão (Patente US 5.004.863; Patente US 5.159.135); soja (Patente US 5.569.834; Patente US 5.416.011); *Brassica* (Patente US 5.463.174); amendoim (Cheng *et al.*, *Plant Cell Rep.* 15: 653-657 (1996); McKently *et al.*, *Plant Cell Rep.* 14: 699-703 (1995)); mamão (Ling, K. *et al.*, *Bio/Technology* 9: 752-758 (1991)); e ervilhas (Grant *et al.*, *Plant Cell Rep.* 15: 254-258 (1995)). Para uma análise de outros métodos comumente utilizados de transformação vegetal, vide Newell, C. A. (*Mol. Biotechnol.* 16: 53-65 (2000)). Um desses métodos de transformação utiliza *Agrobacterium rhizogenes* (Tepfler, M. e Casse-Delbart, F., *Microbiol. Sci.* 4: 24-28 (1987)). A transformação de soja utilizando fornecimento direto de DNA foi publicada utilizando fusão de PEG (documento WO 92/17598), eletroporação (Chowrira, G. M. *et al.*, *Mol. Biotechnol.* 3: 17-23 (1995); Christou, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 3962-3966 (1987)), microinjeção e bombardeamento de partículas (McCabe, D. E. *et al.*, *Bio/Technology* 6: 923 (1988); Christou *et al.*, *Plant Physiol.* 87: 671-674 (1988)).

[0123] Existe uma série de métodos de regeneração de plantas a partir de tecido vegetal. O método de regeneração específico dependerá do tecido vegetal inicial e da espécie de planta específica a ser regenerada. A regeneração, desenvolvimento e cultivo de plantas a partir de transformadores

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

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

Molecular Biology: A Laboratory Manual, eds. Clark, Springer: Nova Iorque (1997).

[0125] Exemplos de plantas oleaginosas incluem, mas sem limitar-se a: soja, espécies de *Brassica*, girassol, milho, algodão, linho e açafrão.

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

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

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

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

[0128] A presente invenção também se refere a uma semente de soja transgênica que contém teor de ácido graxo total aumentado em pelo menos 10% e um teor de ácido oleico aumentado em pelo menos 25% quando comparado com o teor de ácido graxo total e teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula não transgênica. Além disso, a presente invenção refere-se ainda a uma soja transgênica que contém teor de ácido

graxo total aumentado em pelo menos 10% e pelo menos qualquer um dentre (i) um teor de ácido oleico aumentado em pelo menos 25%; (ii) um teor de ácido linolênico reduzido em pelo menos 25%; (iii) um teor de ácido linoleico reduzido em pelo menos 4%; (iv) um teor de ácido palmítico reduzido em pelo menos 8%; e (v) um teor de ácido esteárico aumentado em pelo menos 14% quando comparado com o teor de ácido graxo total e ácido oleico, ácido linolênico, ácido linoleico, ácido palmítico ou ácido esteárico, respectivamente, de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

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

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

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

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

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

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

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

- (a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma construção recombinante que contém pelo menos uma sequência de DGAT; e
- (b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor de ácido graxo total aumentado em pelo menos 10% e teor de ácido palmítico reduzido em pelo menos 8% quando comparado com o teor de ácido graxo total e teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

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

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

com o teor de ácido graxo total e teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

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

[0135] Foi relatada a transformação de monocotiledôneas utilizando eletroporação, bombardeamento de partículas e *Agrobacterium*. Transformação e regeneração vegetal foram atingidas em aspargos (Bytebier *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)* 84: 5354 (1987)); cevada (Wan e Lemaux, *Plant Physiol.* 104: 37 (1994)); *Zea mays* (Rhodes *et al.*, *Science* 240: 204 (1988), Gordon-Kamm *et al.*, *Plant Cell* 2: 603-618 (1990), Fromm *et al.*, *Bio/Technology* 8: 833 (1990), Koziel *et al.*, *Bio/Technology* 11: 194 (1993), Armstrong *et al.*, *Crop Science* 35: 550-557 (1995); aveia (Somers *et al.*, *Bio/Technology* 10: 15-89 (1992)); orquídea (Horn *et al.*, *Plant Cell Rep.* 7: 469 (1988)); arroz (Toriyama *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 205: 34 (1986); Part *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 32: 1135-1148 (1996); Abedinia *et al.*, *Aust. J. Plant Physiol.* 24: 133-141 (1997); Zhang e Wu, *Theor. Appl. Genet.* 76: 835 (1988); Zhang *et al.*, *Plant Cell Rep.* 7: 379 (1988); Battraw e Hall, *Plant Sci.* 86: 191-202 (1992); Christou *et al.*, *Bio/Technology* 9: 957 (1991)); centeio (De la Pena *et al.*, *Nature* 325: 274 (1987)); cana de açúcar (Bower e Birch, *Plant J.* 2: 409 (1992)); festuca alta (Wang *et al.*, *Bio/Technology* 10: 691 (1992)) e trigo (Vasil *et al.*, *Bio/Technology* 10: 667 (1992); Patente US 5.631.152).

[0136] Testes de expressão genética com base na expressão transitória de construções de ácido nucleico clonadas foram desenvolvidos por meio de introdução das moléculas de ácido nucleico em células vegetais por

meio de tratamento com polietileno glicol, eletroporação ou bombardeamento de partículas (Marcotte *et al.*, *Nature* 335: 454-457 (1988); Marcotte *et al.*, *Plant Cell* 1: 523-532 (1989); McCarty *et al.*, *Cell* 66: 895-905 (1991); Hattori *et al.*, *Genes Dev.* 6: 609-618 (1992); Goff *et al.*, *EMBO J.* 9: 2517-2522 (1990)).

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

[0138] Além dos procedimentos discutidos acima, os praticantes são familiares com os materiais de recursos padrão que descrevem condições e procedimentos específicos de construção, manipulação e isolamento de macromoléculas (tais como moléculas de DNA, plasmídeos etc.), geração de organismos recombinantes e a seleção e isolamento de clones (vide, por exemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1989); Maliga *et al.*, *Methods in Plant Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Press (1995); Birren *et al.*, *Genome Analysis: Detecting Genes*, 1, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1998); Birren *et al.*, *Genome Analysis: Analyzing DNA*, 2, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1998); *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Eds. Clark, Springer, Nova Iorque (1997)).

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

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

TABELA 1A**PRODUTOS DE PROTEÍNA DE SOJA DERIVADOS DE SEMENTES DE SOJA^A**

Produtos integrais de soja.	Produtos de proteína de soja processada
Grãos de soja torrados	Farinha com gordura total e desnatada
Grãos de soja assados	Farelo de soja
Broto de soja	Hipocotilédones de soja
Leite de soja	Massa de soja Leite de soja
Ingredientes/alimentos de soja especializados	Isolados de proteína de soja
Leite de soja	Concentrados de proteína de soja
Tofu	Proteína de soja texturizada
Tempeh	Concentrados e farinha texturizada
Miso	Concentrados texturizados
Molho de soja	Isolados texturizados
Proteína vegetal hidrolisada	
Proteína batida	

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

[0141] “Processamento” designa qualquer método físico-químico utilizado para obter os produtos relacionados na Tabela 1A e inclui, mas sem limitar-se a condicionamento a quente, transformação em flocos e moagem, extrusão, extração de solvente ou embebedimento aquoso e extração de sementes inteiras ou parciais.

[0142] Além disso, “processamento” inclui os métodos utilizados

para concentrar e isolar proteína de soja a partir de sementes inteiras ou parciais, bem como os diversos métodos orientais tradicionais de preparação de produtos alimentícios de soja fermentados.

[0143] Padrões e Especificações Comerciais foram estabelecidos para muitos desses produtos (vide *National Oilseed Processors Association Yearbook and Trading Rules 1991-1992*).

[0144] Os produtos denominados como sendo “alto teor de proteína” ou “baixo teor de proteína” são os descritos pelas Especificações Padrão. “NSI” designa o Índice de Solubilidade de Nitrogênio conforme definido por meio do Método Ac4 41 da Sociedade Norte-Americana de Químicos de Óleo. “Solubilidade de Nitrogênio KOH” é um indicador da qualidade de massa de soja e designa a quantidade de nitrogênio solúvel em 0,036 M de KOH sob as condições descritas por Araba e Dale ((1990) *Poult. Sci.* 69: 76-83).

[0145] Flocos “brancos” designam cotilédones descascados e transformados em flocos que tenham sido desnatados e tratados com calor com umidade controlada para que possuíssem NSI de cerca de 85 a 90. Esta expressão pode também designar uma farinha com NSI similar que tenha sido moída até passar através de um tamanho de Peneira Padrão Norte-Americano nº 100. “Cozido” designa um produto de proteína de soja, tipicamente uma farinha, com NSI de cerca de 20 a 60.

[0146] “Torrado” designa um produto de proteína de soja, tipicamente uma farinha, com NSI abaixo de 20. “Farelos” designam cotilédones descascados e desnatados que possuem um tamanho de peneira padrão norte-americano nº 10 a 80.

[0147] “Concentrados de proteína de soja” designam os produtos elaborados a partir de grãos de soja desnatados e descascados por meio de três processos básicos: lixiviação ácida (cerca de pH 4,5), extração com álcool (cerca de 55 a 80%) e desnaturação da proteína com

calor úmido antes da extração com água.

[0148] As condições tipicamente utilizadas para preparar concentrados de proteína de soja foram descritas por Pass ((1975) Patente US 3.897.574; Campbell *et al.* (1985) em *New Protein Foods*, Ed. por Altschul e Wilcke, Academic Press, Vol. 5, Capítulo 10, *Seed Storage Proteins*, págs. 302-338).

[0149] “Extrusão” designa processos por meio dos quais materiais (farelos, farinha ou concentrado) passam através de um auger com camisa (*jacketed auger*) utilizando altas pressões e temperaturas como um meio de alteração da textura do material. “Texturização” e “estruturização” designam processos de extrusão utilizados para modificar as características físicas do material.

[0150] As características destes processos, que incluem extrusão termoplástica, foram descritas anteriormente [Atkinson (1970), Patente US 3.488.770, Horan (1985) em *New Protein Foods*, Ed. de Altschul e Wilcke, Academic Press, Vol. 1A, Capítulo 8, págs. 367-414].

[0151] Além disso, as condições utilizadas durante o processamento por extrusão de misturas alimentícias complexas que incluem produtos de proteína de soja foram descritas anteriormente (Rokey (1983), *Feed Manufacturing Technology III*, 222-237; McCullouch, Patente US 4.454.804).

TABELA 1B

ETAPAS GENERALIZADAS DE PRODUÇÃO DE ÓLEO E SUBPRODUTOS DE SOJA

Etapas do processo	Processo	Impurezas removidas e/ou subprodutos obtidos
nº 1	semente de soja	
nº 2	extração de óleo	massa

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

[0152] Mais especificamente, as sementes de soja são limpas, temperadas, descascadas e transformadas em flocos, de forma a aumentar a eficiência da extração de óleo. A extração de óleo normalmente é realizada por meio de extração com solvente (tal como hexano), mas pode também ser atingida por meio de uma combinação de pressão física e/ou extração de solvente. O óleo resultante é denominado óleo bruto. O óleo bruto pode ter gordura retirada por meio da hidratação de fosfolipídios e outros complexos de lipídios polares e neutros que facilitam a sua separação da fração de triglicérides não hidratante (óleo de soja).

[0153] As gomas de lecitina resultantes podem ser adicionalmente processadas para elaborar produtos de lecitina comercialmente importantes utilizados em uma série de produtos alimentícios e industriais como agentes de emulsificação e liberação (ou seja, antiaglutinantes). Óleo com gordura retirada pode ser adicionalmente refinado para remoção de impurezas (principalmente ácidos graxos livres, pigmentos e gomas residuais). O refino é realizado por

meio da adição de um agente cáustico que reage com ácido graxo livre para formar sabão e hidrata fosfatídeos e proteínas no óleo bruto. Utiliza-se água para lavar traços de sabão formados durante o refino. O subproduto de sabão pode ser utilizado diretamente em alimentos animais ou acidulados para recuperar os ácidos graxos livres. A coloração é removida por meio de adsorção com uma terra lixiviadora que remove a maior parte dos compostos de clorofila e carotenoide. O óleo refinado pode ser hidrogenado, de forma a resultar em gorduras com diversas texturas e propriedades de fusão. A winterização (fracionamento) pode ser utilizada para remover estearina do óleo hidrogenado por meio de cristalização sob condições de resfriamento cuidadosamente controladas. A desodorização (principalmente por meio de destilação de vapor a vácuo) é a última etapa e é projetada para remover compostos que proporcionam odor ou aroma ao óleo. Outros subprodutos valiosos tais como tocoferóis e esteróis podem ser removidos durante o processo de desodorização. Destilado desodorizado que contém esses subprodutos pode ser vendido para a produção de vitamina E natural e outros produtos farmacêuticos de alto valor. Gorduras e óleos refinados, lixiviados (hidrogenados, fracionados) e desodorizados podem ser embalados e vendidos diretamente ou adicionalmente processados em produtos mais especializados. Uma referência mais detalhada ao processamento de sementes de soja, produção de óleo de soja e utilização de subprodutos pode ser encontrada em Erickson, *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*, The American Oil Chemists' Society and United Soybean Board (1995). Óleo de soja é líquido à temperatura ambiente porque contém teor relativamente baixo de ácidos graxos saturados quando comparado com óleos tais como coco, palma, semente de palma e manteiga de cacau.

[0154] Óleos vegetais e de micróbios que contêm PUFAs que foram refinados e/ou purificados podem ser hidrogenados, de forma a resultar

em gorduras com diversas texturas e propriedades de fusão. Muitas gorduras processadas (incluindo espalhantes, gorduras de confeitaria, manteigas duras, margarinas, coberturas de cozimento etc.) necessitam de vários graus de solidez à temperatura ambiente e podem apenas ser produzidos por meio de alteração das propriedades físicas do óleo fonte. Isso é mais comumente atingido por meio de hidrogenação catalítica.

[0155] Hidrogenação é uma reação química na qual adiciona-se hidrogênio às ligações duplas de ácidos graxos insaturados com o auxílio de um catalisador tal como níquel. Óleo de soja com alto teor oleico, por exemplo, contém ácidos graxos oleico, linoleico e linolênico insaturados e cada um deles pode ser hidrogenado. A hidrogenação possui dois efeitos primários. Em primeiro lugar, a estabilidade oxidativa do óleo aumenta como resultado da redução do teor de ácido graxo insaturado. Em segundo lugar, as propriedades físicas do óleo são alteradas porque as modificações de ácidos graxos aumentam o ponto de fusão, resultando em uma gordura semilíquida ou sólida à temperatura ambiente.

[0156] Existem diversas variáveis que afetam a reação de hidrogenação que, por sua vez, alteram a composição do produto final. Condições de operação que incluem pressão, temperatura, tipo de catalisador e concentração, agitação e projeto de reator encontram-se entre os parâmetros mais importantes que podem ser controlados. Podem ser utilizadas condições de hidrogenação seletivas para hidrogenar os ácidos graxos mais insaturados em preferência sobre os menos insaturados. Emprega-se frequentemente hidrogenação muito leve ou rápida para aumentar a estabilidade de óleos líquidos. Hidrogenação adicional converte um óleo líquido em uma gordura fisicamente sólida. O grau de hidrogenação depende das características de fusão e desempenho desejadas projetadas para o produto final específico. Coberturas líquidas (utilizadas na fabricação de produtos de cozimento,

gorduras sólidas e coberturas utilizadas para operações comerciais de fritura e torração) e estoques base para fabricação de margarina encontram-se entre a série de produtos de gordura e óleo possíveis atingidos por meio de hidrogenação. Uma descrição mais detalhada de hidrogenação e produtos hidrogenados pode ser encontrada em Patterson, H. B. W., *Hydrogenation of Fats and Oils: Theory and Practice*, Sociedade Norte-Americana de Químicos de Óleo (1994).

[0157] Óleos hidrogenados tornaram-se um tanto controversos devido à presença de isômeros de ácidos graxos *trans* resultantes do processo de hidrogenação. A ingestão de grandes quantidades de isômeros *trans* foi relacionada a efeitos prejudiciais à saúde que incluem razões mais altas entre lipoproteínas de baixa densidade e alta densidade no plasma sanguíneo e aumento do risco de doenças cardíacas coronarianas.

[0158] Em ainda outro aspecto, a presente invenção refere-se a um polinucleotídeo isolado que compreende:

(a) uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que possui atividade de diacilglicerol aciltransferase, em que o polipeptídeo é descrito em SEQ ID NO 83, 88 ou 93; ou

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

[0159] Além disso, uma construção de DNA recombinante que compreende o fragmento de ácido nucleico isolado ligado operacionalmente a pelo menos uma sequência reguladora. Da mesma forma, uma célula que compreende no seu genoma a construção de DNA recombinante. A célula pode ser parte de uma planta oleaginosa, tal como, mas sem limitar-se a soja, milho, canola, girassol, linho, algodão e açafrão.

[0160] Por fim, a presente invenção refere-se a um método para

aumentar o teor de ácido graxo total de uma semente oleaginosa que compreende:

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

EXEMPLOS

[0161] A presente invenção é adicionalmente definida nos Exemplos a seguir, nos quais as partes e percentuais são em peso e os graus são Celsius, a menos que indicado em contrário. Dever-se-á observar que estes Exemplos, embora indiquem realizações preferidas da presente invenção, são fornecidos unicamente como forma de ilustração. A partir da discussão acima e destes Exemplos, os técnicos no assunto podem determinar as características essenciais da presente invenção e, sem abandonar o seu espírito e escopo, podem realizar diversas alterações e modificações da presente invenção para adaptá-las a vários usos e condições. Desta forma, diversas modificações da presente invenção além das exibidas e descritas no presente serão evidentes para os técnicos no assunto a partir da descrição acima. Essas modificações também se destinam a enquadrar-se no escopo das reivindicações anexas.

[0162] O significado de abreviações é o seguinte: “seg” indica segundo(s), “min” indica minuto(s), “h” indica hora(s), “d” indica dia(s), “μl” indica microlitro(s), “ml” indica mililitro(s), “l” indica litro(s), “μM” indica micromolar, “mM” indica milimolar, “M” indica molar, “mmol” indica milimol(es), “μmol” indica micromol(es), “g” indica grama(s), “μg” indica micrograma(s), “ng” indica nanograma(s), “U” indica unidade(s), “bp” indica par(es) de bases e “kB”

indica quilobase(s).

EXEMPLO 1

EXPRESSÃO DE GENES DGAT DE *YARROWIA LIPOLYTICA* EM *SACCHAROMYCES*

CEREVISIAE:

[0163] O gene DGAT1 (SEQ ID Nº 1) de *Yarrowia lipolytica* foi extirpado do vetor de plasmídeo pYDA1 (SEQ ID Nº 2) por meio de digestão de restrição com NcoI e NotI. As extremidades de fragmento de DNA foram completamente preenchidas utilizando T4 DNA polimerase (Promega, Madison WI, Estados Unidos) e ligadas ao local Not I exclusivo de pY75 (SEQ ID Nº 3). Antes do seu uso para clonagem, o vetor pY75 havia sido linearizado com NotI, preenchido com T4 DNA polimerase e desfosforilado com fosfatase alcalina de camarão (NEB, Beverly MA, Estados Unidos). O DNA de plasmídeo foi isolado utilizando métodos padrão e digestões de restrição com EcoRI foram conduzidas para identificar clones de plasmídeos em que o códon inicial encontrava-se próximo à extremidade 3' do promotor GPD em pY75 (orientação com sentido do gene DGAT1). Este plasmídeo é denominado a seguir pY75 YL DGAT1 (SEQ ID Nº 4). A construção de pYDA1 é descrita no documento WO 2006/052914, que é incorporado ao presente como referência.

[0164] O vetor do tipo plasmídeo episomal de levedura (YE_p) pRS425 (SEQ ID Nº 5) (Christianson et al., Gene 110: 119-122 (1992)) contém sequências do plasmídeo endógeno de dois micra de *Saccharomyces cerevisiae*, um marcador selecionável LEU2 e sequências baseadas na cadeia principal de um fagomídeo multifuncional, pBluescript II SK(+). O promotor de 3-fosfato de gliceraldeído desidrogenase (GPD) constitutivo forte de *Saccharomyces cerevisiae* foi clonado entre os locais SacII e SpeI de pRS425 da mesma forma descrita por Jia et al. (Physiol. Genomics 3: 83-92 (2000)) para produzir pGPD-425 (SEQ ID Nº 6). Um local NotI foi introduzido no local BamHI de pGPD-425, de forma a gerar um local NotI ladeado por locais BamHI

e este plasmídeo foi denominado pY75 (SEQ ID Nº 3). O gene DGAT2 foi amplificado por PCR a partir do genoma de *Yarrowia lipolytica* (Acesso ATCC nº 20362) conforme segue. Células de levedura foram cultivadas sobre meio YPD sólido por 72 horas. As células foram novamente suspensas em 200 µl de tampão de extração de DNA (100 mM de Tris, pH 7,5, 10 mM de EDTA, 100 mM de NaCl, 0,1% Triton X-100) e suplementadas com duas a cinco esferas de vidro (diâmetro de 3 mm) e cerca de 0,1 g de esferas de vidro (0,5 mm de diâmetro). A suspensão de células de levedura foi misturada vigorosamente utilizando um misturador por turbilhonamento e incubada a 75 °C por 25 minutos. O lisado foi resfriado à temperatura ambiente e limpo por meio de centrifugação.

[0165] Os dois primers de oligonucleotídeos a seguir foram utilizados para gerar um fragmento de PCR de cerca de 1600 bp:

oYLDGAT2-1:

GCGGCCGCATGACTATCGACTCAATACTACAAGT (SEQ ID Nº 7); e

oYLDGAT2-2:

GCGGCCGCTTACTCAATCATTCGGAAGTCTGGGGCT (SEQ ID Nº 8).

[0166] Resumidamente, foi criada uma mistura de reação de PCR (100 µl) que contém 2,5 mM de MgCl₂, 2 mM de dNTPs, 10 mM de Tris/HCl (pH 8,8), 50 mM de KCl, 0,08% Nonidet P40, 1 µM de oYLDGAT2-1 (SEQ ID Nº 7) e oYLDGAT2-2 (SEQ ID Nº 8), 10 U Taq polimerase (Fermentas, Hanover MD) e 2 µl de lisado de levedura. A mistura de PCR foi dividida em quatro parcelas de 25 µl e amplificação foi conduzida por 35 ciclos, em que cada qual compreende 45 segundos a 94 °C, 45 segundos na temperatura de combinação correspondente e um minuto a 72 °C. Os produtos de PCR foram purificados com gel e clonados em pGEM T-easy (Promega) utilizando instruções do fabricante.

[0167] Dez clones de plasmídeo independentes foram

completamente sequenciados. A sequência de consenso desta análise é definida como SEQ ID Nº 9. Esta sequência de DNA difere da sequência de DGAT2 descrita no documento WO 2005/003322 em duas posições de nucleotídeos diferentes. A diferença da sequência de DNA afeta nt 448 e nt 672 do quadro de leitura aberta de DGAT2. A diferença de nt anterior altera a sequência de aminoácidos previstos da proteína DGAT. Ela substitui uma serina encontrada na sequência de DGAT descrita no documento WO 2005/003322 com um resíduo de treonina. A segunda diferença de sequência não altera a sequência de aminoácidos da descrita no documento WO 2005/003322. A diferença entre a sequência de DGAT2 de *Yarrowia lipolytica* descrita no presente e a do documento WO 2005/003322 pode ser atribuída às diferentes linhagens de *Yarrowia lipolytica* que foram utilizadas para isolamento do gene DGAT2. A sequência de aminoácidos prevista da proteína DGAT da linhagem com Acesso ATCC nº 20362 é descrita em SEQ ID Nº 10.

[0168] O gene DGAT (SEQ ID Nº 9) foi extirpado na forma de um fragmento de restrição de *Not* I do vetor pGEM T-easy e ligado a DNA desfosforilado linearizado com *Not*I de pY75 (SEQ ID Nº 3). DNA de plasmídeo foi isolado de clones recombinantes e a digestão de restrição com *Sac*I e *Pac*I permitiu a identificação de clones em que o códon de início do gene DGAT2 encontrava-se próximo da extremidade 3' do promotor GPD em pY75 (orientação com sentido do gene DGAT2). Este plasmídeo é denominado a seguir pY75 YL DGAT2 (SEQ ID Nº 11).

[0169] DNA de plasmídeo de pY75 YL DGAT1 (SEQ ID Nº 4) e o vetor pY75 vazio foram transformados na linhagem INVSC1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Invitrogen, Estados Unidos) utilizando métodos padrão (Gletz, R. Daniel; Woods, Robin A., *Meth. Enzymol.* 350: 87-96 (2002)). Colônias de leveduras recombinantes foram selecionadas sobre meios DOBA suplementados com CSM-leu (Qbiogene, Carlsbad CA). Cinco cultivos de 50

ml de meios DOBA suplementados com CSM-leu foram inoculados com cinco colônias geradas independentemente e cultivados a 30 °C por 72 horas.

[0170] As células foram colhidas por meio de centrifugação e novamente suspensas em meio idêntico ao meio DOBA descrito acima, com a exceção da omissão de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

[0171] Os cultivos cresceram por sessenta horas adicionais e as células foram colhidas por meio de centrifugação. As células foram cultivadas sobre gelo seco e liofilizadas.

[0172] O teor de ácido graxo total de cada amostra de célula de levedura foi medido em triplicata conforme segue. Cerca de 5 a 15 mg de pó de levedura foram pesados no fundo de um tubo de cultivo de vidro de 13 x 100 mm com tampa de rosca e vedação de Teflon. Foram adicionados 5 µl de uma solução padrão de 17:0 TAG (10 mg/ml em tolueno), seguidos pela adição de 500 µl de ácido sulfúrico a 5% em metanol (anidro). Amostras foram incubadas a 95 °C por uma hora e meia.

[0173] Em seguida, tubos foram mantidos em resfriamento à temperatura ambiente, após o quê adicionou-se 1 ml de 1 M cloreto de sódio, seguido por mistura. Adicionou-se 1 ml de heptano, o conteúdo foi misturado e as amostras foram rapidamente centrifugadas para mediar a separação de fases.

[0174] Cerca de 500 µl da fase orgânica foram transferidos para uma ampola de GC. Metil ésteres de ácidos graxos foram analisados por meio de cromatografia de gases. Quatro microlitros de extrato de heptano foram analisados em um Cromatógrafo de Gases Hewlett-Packard 6890 equipado com uma coluna capilar de sílica fundida Omegawax 320 (Supelco Inc., Catálogo nº 24152). A temperatura do forno foi programada para manter-se a 220 °C por 2,7 minutos, aumentar para 240 °C a 20 °C/minuto e, em seguida, mantida por 2,3 minutos adicionais. Gás veículo foi fornecido por um gerador

de hidrogênio Whatman. Os tempos de retenção foram comparados com os de metil ésteres de padrões disponíveis comercialmente (Nu-Chek Prep, Inc., catálogo nº U-99-A).

[0175] DNA de plasmídeo de pY75 YL DGAT2 (SEQ ID Nº 11) e o vetor pY75 vazio foram transformados na linhagem INVSC1 de *Saccharomyces cerevisiae* e o teor de ácido graxo total de cultivos de levedura foi analisado conforme descrito anteriormente. As descobertas relativas à sobreexpressão dos dois genes DGAT em levedura encontram-se resumidas na Tabela 2.

TABELA 2

TEOR DE ÁCIDO GRAXO TOTAL DE CULTIVOS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

	% ácido palmítico	% ácido palmitoleico	% ácido esteárico	% ácido oleico	FAME (% DCW)	Desvio Padrão	FAME médio (% DCW)	Desvio Padrão FAME (% DCW)
pY75	19,1	38,4	7,5	34,9	12,8	2,2	11,9	0,8
YL	19,4	38,8	7,4	34,3	12,3	0,4		
DGAT1	19,2	38,4	7,6	34,8	12,2	0,4		
	19,3	38,6	7,5	34,6	11,5	0,1		
	19,1	38,3	7,7	34,9	10,9	0,6		
pY75	17,9	37,8	7,9	36,4	10,7	1,0	9,3	0,9
	18,2	38,2	7,8	35,8	9,7	0,6		
	17,9	41,0	6,8	34,2	8,7	0,3		
	17,2	40,5	6,9	35,4	8,7	0,6		
	18,1	41,1	6,9	33,9	8,5	0,2		

	% ácido palmítico	% ácido palmitoleico	% ácido esteárico	% ácido oleico	FAME (% DCW)	Desvio Padrão	FAME médio (% DCW)	Desvio Padrão FAME (% DCW)
pY75	31,8	34,0	14,2	20,0	17,1	0,2	14,2	2,3
YL	31,4	33,1	14,8	20,6	15,9	0,6		
DGAT2	30,7	32,8	14,7	21,8	13,6	1,1		
	28,9	34,2	13,5	23,5	12,4	1,4		
	29,2	34,1	13,5	23,1	11,8	1,7		
pY75	19,7	37,0	9,6	33,7	7,0	0,4	6,6	0,2
	20,0	36,4	9,8	33,7	6,8	0,0		
	19,6	37,0	9,6	33,8	6,6	0,6		
	19,7	37,1	9,5	33,6	6,4	0,2		
	19,3	36,9	9,7	34,1	6,4	0,3		

[0176] A Tabela 2 demonstra que existe um aumento significativo de ácidos graxos totais em células de levedura que abrigam o pY75 YL DGAT1 (SEQ ID Nº 4) quando comparado com células que contêm apenas o plasmídeo pY75 vazio. O percentual em peso de células secas (DCW) de ácido graxo médio de cinco cultivos independentes é de 11,9% quando comparado com 9,3% para controles de vetor cultivados sob condições idênticas. Resumidamente, existe um aumento de 28% na produção total de ácidos graxos. Além disso, existe uma leve alteração no perfil de ácidos graxos associado à expressão de YL DGAT1 caracterizada por um aumento de ácido palmítico.

[0177] A expressão constitutiva de YL DGAT2 sob escassez de nitrogênio aumentou o teor de ácido graxo total em 110% quando comparado

com um controle de vetor cultivado sob condições idênticas. O teor de ácido graxo total do vetor apenas controle foi de 6,6%, embora o teor médio de ácido graxo dos transformadores YL DGAT2 fosse de 14,2%. O perfil de ácido graxo foi alterado como resultado da expressão de YL DGAT2. O teor de ácido palmítico aumentou significativamente, acompanhado por uma redução moderada de palmitoleico. Além disso, o teor de ácido graxo aumentou significativamente, acompanhado por uma clara redução do teor de oleico. Tomados em conjunto, os resultados demonstram que a sobreexpressão de YL DGATs em levedura sob condições de maiores razões entre carbono e nitrogênio gera aumento do acúmulo de ácidos graxos. As enzimas YL DGAT sobreexpressas são capazes de aumentar a atividade de DGAT endógena em *Saccharomyces cerevisiae*. Experimentos similares foram repetidos com os dois genes DGAT mais duas vezes. Uma diferença do teor de ácidos graxos entre o cultivo de YL DGAT e o controle de vetor pôde sempre ser observada e foi de pelo menos 8% e 14,3% para YL DGAT1 (SEQ ID Nº 1) e YL DGAT2 (SEQ ID Nº 9), respectivamente.

EXEMPLO 2

CLONAGEM DO DGAT1 E DGAT2 DE *YARROWIA LIPOLYTICA* EM VETORES DE EXPRESSÃO DE *YARROWIA LIPOLYTICA*

[0178] O presente Exemplo descreve a geração de pFBAIN-YDG1 e pFBAIN-YDG2, que compreende um gene FBAINm::YDGAT1::PEX20 quimérico e um gene FBAINm::YDGAT2::PEX20 quimérico, respectivamente (Figuras 1A e 1B). Estes foram projetados para sobreexpressão do DGAT1 e DGAT2 em *Yarrowia lipolytica*.

[0179] Os oligonucleotídeos YDGAT1-F (SEQ ID Nº 12) e YDGAT-R (SEQ ID Nº 13) foram projetados e sintetizados para permitir a amplificação do DGAT1 ORF de DNA genômico de *Yarrowia lipolytica* (isolado a partir da linhagem com Acesso ATCC nº 20362, adquirido da Coleção Norte-

Americana de Cultivo de Tipos (Rockville MD)), enquanto os oligonucleotídeos YDGAT2-F (SEQ ID Nº 14) e YDGAT2-R (SEQ ID Nº 15) foram projetados e sintetizados para permitir a amplificação do DGAT2 ORF.

[0180] As reações de PCR, com DNA genômico de *Yarrowia lipolytica* como modelo, foram conduzidas individualmente em um volume total de 50 µl que compreende: 1 µl de DNA genômico (100 ng), 10 µl de 5X tampão PCR, 1 µl de mistura dNTP (10 µM cada), 35 µl de água e 1 µl de polimerase Phusion (New England Biolabs, Inc., Ipswich MA). A amplificação foi conduzida a 98 °C por um minuto, seguida por trinta ciclos a 98 °C por dez segundos, 55 °C por dez segundos e 72 °C por trinta segundos, seguida por um ciclo final de alongamento a 72 °C por cinco minutos. Foram gerados um fragmento de DNA de 1603 bp (SEQ ID Nº 16) e um fragmento de 1567 bp (SEQ ID Nº 17) que continham os ORFs DGAT1 e DGAT2, respectivamente.

[0181] Os fragmentos de PCR foram purificados com kits de purificação de PCR Qiagen seguindo o protocolo do fabricante. As amostras de DNA purificadas foram digeridas com *Nco*I e *Not*I, purificadas com um kit de limpeza de reação Qiagen e, em seguida, ligadas direcionalmente com pFBAIN-MOD-1 digerida por *Nco*I/*Not*I (Figura 1C; SEQ ID Nº 18). Especificamente, a reação de ligação continha: 10 µl de 2X tampão de ligação, 1 µl de T4 DNA ligase (Promega), 4 µl (cerca de 300 ng) do fragmento de 1600 bp (ou seja, DGAT1; SEQ ID Nº 16) ou o fragmento de 1564 bp (ou seja, DGAT2; SEQ ID Nº 17) e 1 µl de pFBAIN-MOD-1 (cerca de 150 ng). As misturas de reação foram incubadas à temperatura ambiente por duas horas e utilizadas para transformar células competentes de *E. coli* Top10 (Invitrogen). DNA de plasmídeo de transformadores foi recuperado utilizando um kit Qiagen Miniprep. Clones corretos foram identificados por meio de mapeamento de restrição e as construções finais foram denominadas “pFBAIN-YDG1” e “pFBAIN-YDG2”, respectivamente.

[0182] Desta forma, pFBAIN-YDG1 (Figura 1A; SEQ ID Nº 19)

continha os componentes a seguir:

TABELA 3

COMPONENTES DO PLASMÍDEO pFBAIN-YDG1 (SEQ ID N° 19)

Locais de RE e nucleotídeos em SEQ ID N° 19	Descrição de fragmentos e componentes de genes químicos
<i>BglIII-BsiWI</i> (6040-301)	FBAINm::YDG1::PEX20, que compreende: - FBAINm: promotor FBAINm de <i>Yarrowia lipolytica</i> (Publicação PCT n° WO 2005/049805) - YDG1: <i>Y. lipolytica</i> DGAT1 ORF (SEQ ID N° 16) - Pex20: sequência terminal de Pex20 do gene Pex20 de <i>Yarrowia</i> (Acesso GenBank n° AF054613)
<i>PacI-BglIII</i> (4533-6040)	<i>Yarrowia URA3</i> (Acesso GenBank n° AJ306421)
(3123-4487)	Sequência de reprodução autônoma de <i>Yarrowia</i> 18 (<i>ARS18</i> ; Acesso GenBank n° M91600 e n° A17608)
(2464-2864)	Origem f1
(1424-2284)	Gene de resistência à ampicilina (<i>Amp^R</i>) para seleção em <i>E. coli</i>
(474-1354)	Origem de reprodução de plasmídeo <i>ColE1</i>

[0183] O plasmídeo pFBAIN-YDG2 (Figura 1B; SEQ ID N° 20) continha componentes idênticos aos de pFBAIN-YDG1, com exceção da presença de DGAT2 ORF de *Yarrowia lipolytica* (SEQ ID N° 17; identificado como YDG2 na Figura 1B) em vez de DGAT1 ORF de *Yarrowia lipolytica* em pFBAIN-YDG1.

[0184] A expressão “promotor de FBAINm” ou “região promotora

de FBAINm” é uma versão modificada do promotor de FBAIN (abaixo), em que FBAINm possui uma exclusão de 52 bp entre o códon de início de tradução de ATG e o íntron do promotor de FBAIN (de forma a incluir apenas 22 aminoácidos do terminal N) e um novo motivo de consenso de tradução após o íntron. Além disso, embora o promotor de FBAIN gere uma proteína de fusão quando fundido com a região de codificação de um gene a ser expresso, o promotor de FBAINm não gera essa proteína de fusão. O promotor de FBAIN designa a região não traduzida acima no fluxo 5’ em frente ao códon de início de tradução “ATG” da enzima de frutose-bifosfato aldolase de *Yarrowia lipolytica* (E. C. 4.1.2.13) codificada pelo gene *fba1* e que é necessária para expressão, mais uma parte de região de codificação 5’ que possui um íntron do gene *fba1*. Estes promotores são descritos em detalhes no documento WO 2005/049805 e na Patente US 7.202.356, que são integralmente incorporadas ao presente como referência.

EXEMPLO 3

SOBREEXPRESSÃO DE GENES DGAT1 E DGAT2 DE *YARROWIA LIPOLYTICA* NA

LINHAGEM Y2224 DE *YARROWIA LIPOLYTICA*:

[0185] O Exemplo do presente descreve teor aumentado de ácidos graxos e modificação para a abundância relativa de cada substância de ácido graxo em linhagem Y2224 de *Yarrowia lipolytica* que foi transformada para coexpressar o DGAT1 de *Yarrowia lipolytica* (SEQ ID N° 16) ou DGAT2 de *Yarrowia lipolytica* (SEQ ID N° 17). A linhagem Y2224 é um mutante resistente a FOA de uma mutação autônoma do gene *Ura3* de linhagem de *Yarrowia* do tipo selvagem com Acesso ATCC n° 20362.

[0186] Geração de linhagem Y2224: a linhagem Y2224 foi isolada conforme segue: células de *Yarrowia lipolytica* com Acesso ATCC n° 20362 de uma placa Agar YPD (1% extrato de levedura, 2% bactopectona, 2% glicose, 2% Agar) foram riscados sobre uma placa com meios mínimos (75 mg/l cada

de uracil e uridina, 6,7 g/l de YNB com sulfato de amônia, sem aminoácido, e 20 g/l de glicose) contendo 250 mg/l de 5-FOA (mono-hidrato de ácido 5-fluoroacil-6-carboxílico; Zymo Research). As placas foram incubadas a 28 °C e quatro das colônias resultantes foram colocadas em emplastros separadamente sobre placas com meios mínimos (MM) contendo 200 mg/ml de 5-FOA e placas com MM que não contêm uracil e uridina para confirmar a auxotrofia de uracil *Ura3*.

[0187] Transformação de linhagem Y2224: um clone de pFBAln-YDG1, um clone de pFBAln-YDG2 e plasmídeo controle pFBAln-MOD-1 foram transformados em linhagem Y2224 de *Yarrowia lipolytica* conforme descrito abaixo.

[0188] A transformação de *Yarrowia lipolytica* foi realizada de acordo com o método de Chen, D. C. *et al.* (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48 (2): 232-235 (1997)), a menos que indicado em contrário. Resumidamente, *Yarrowia* foi riscada sobre uma placa Agar YPD e cultivada a 30 °C por cerca de dezoito horas. Diversos circuitos grandes de células foram raspados da placa e novamente suspensos em 1 ml de tampão de transformação contendo: 2,25 ml de 50% PEG, MW médio 3350; 0,125 ml de 2 M acetato de lítio, pH 6,0; 0,125 ml de 2 M DTT; e 50 µg de DNA de esperma de salmão cortado. Em seguida, cerca de 500 ng de DNA de plasmídeo linearizado foram incubados em 100 µl de células novamente suspensas e mantidos a 39 °C por uma hora com mistura por turbilhonamento em intervalos de quinze minutos.

[0189] As células de cada transformação foram colocadas sobre placas com meios mínimos (MM) que não contêm uracil (0,17% de base de nitrogênio de levedura (DIFCO Laboratories, Detroit MI) sem sulfato de amônio ou aminoácidos, 2% glicose, 0,1% prolina, pH 6,1, 20 g/l de Agar) e mantidas a 30 °C por dois dias. Três transformadores de cada placa de transformação foram utilizados para inocular cultivo de 25 ml individual em meio MM (0,17% base de nitrogênio de levedura (DIFCO Laboratories) sem sulfato de amônio

nem aminoácidos, 2% de glicose, 0,1% de prolina, pH 6,1). Cada cultivo foi mantido em crescimento por dois dias a 30 °C e comutado em seguida para 25 ml de meio com alto teor de glicose (“meio HG”, que compreende 80 g/l de glicose, 27 g/l de K₂HPO₄, 6,3 g/l de KH₂PO₄, pH de cerca de 7,5) e mantido em crescimento por cinco dias a 30 °C.

[0190] Análise de lipídios: o total de lipídios foi extraído e metil ésteres de ácidos graxos (FAMES) foram preparados por meio de transesterificação e analisados em seguida com um GC Hewlett-Packard 6890.

[0191] Mais especificamente, para análise de ácidos graxos, as células foram recolhidas por meio de centrifugação e lipídios foram extraídos conforme descrito em Bligh, E. G. e Dyer, W. J. (*Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917 (1959)). Metil ésteres de ácidos graxos foram preparados por meio de transesterificação do extrato de lipídios com metóxido de sódio (Roughan, G. e Nishida, I., *Arch. Biochem. Biophys.* 276 (1): 38-46 (1990)) e analisados em seguida com um GC Hewlett-Packard 6890 equipado com uma coluna HP-INNOWAX (Hewlett-Packard) de 30 m x 0,25 mm (d. i.). A temperatura do forno foi de 170 °C (manutenção por 25 minutos) a 185 °C a 3,5 °C/minuto.

[0192] Para transesterificação de bases direta, cultivo de *Yarrowia* (3 ml) foi colhido, lavado uma vez em água destilada e seco a vácuo em um Speed-Vac por cinco a dez minutos. Adicionou-se metóxido de sódio (100 µl de 1%) à amostra e, em seguida, a amostra foi turbilhonada e agitada por vinte minutos. Após a adição de três gotas de 1 M NaCl e 400 µl de hexano, a amostra foi turbilhonada e centrifugada. A camada superior foi removida e analisada por meio de GC conforme descrito acima.

[0193] Com base nas análises acima, o teor de lipídios e a composição foram determinados em linhagens transformadoras de Y2224, que compreende pFBAIn-YDG1, pFBAIn-YDG2 e pFBAIN-MOD-1 (controle), respectivamente, conforme exibido abaixo na Tabela 4. Três transformadores

independentes de cada linhagem foram analisados e os resultados médios são exibidos nas fileiras destacadas em cinza. Ácidos graxos são identificados como 16:0 (palmitato), 16:1 (ácido palmitoleico), 18:0, 18:1 (ácido oleico) e 18:2 (LA); e a composição de cada um deles é apresentada na forma de percentual do total de ácidos graxos.

[0194] “% FAME/DCW” representa o percentual em peso de células secas de metil éster de ácidos graxos. O peso de células secas foi determinado por meio de coleta de células de 10 ml de cultivo por meio de centrifugação, lavagem das células com água uma vez para remover meio de resíduo, secagem das células em um forno a vácuo a 80 °C por uma noite e pesagem das células secas. A quantidade total de metil ésteres de ácidos graxos em uma amostra foi determinada comparando-se as áreas de todos os picos no perfil de GC com a área de pico de uma quantidade conhecida adicionada de padrão interno ácido graxo C15:0.

TABELA 4

COMPOSIÇÃO E TEOR DE LIPÍDIOS EM LINHAGEM Y2224 DE *YARROWIA QUE*
SOBREEXPRESSA YDGAT1 E YDGAT2

Amostra	Plasmídeo	% FAME/ DCW	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2
1	pFBAIn- MOD-1	21,91	15,96	16,41	6,01	40,28	18,36
2	pFBAIn- MOD-1	23,98	16,72	15,90	5,97	39,64	18,21
3	pFBAIn- MOD-1	18,27	14,42	15,74	5,59	41,07	19,89
Média 1-	Média	21,39	15,70	16,02	5,86	40,33	18,82

Amostra	Plasmídeo	% FAME/ DCW	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2
3	pFBAIn-MOD-1						
4	pFBAIn-YDG1	22,50	15,76	16,74	5,95	40,72	17,79
5	pFBAIn-YDG1	24,38	14,76	18,86	4,60	43,90	15,89
6	pFBAIn-YDG1	24,22	15,20	18,42	4,66	43,20	16,1
Média 4-6	Média pFBAIn-YDG1	23,70	15,24	18,01	5,97	42,61	16,59
7	pFBAIn-YDG2	23,51	13,56	13,55	7,70	46,20	16,45
8	pFBAIn-YDG2	29,30	15,10	12,87	8,00	45,49	15,24
9	pFBAIn-YDG2	29,15	14,57	13,74	8,44	47,00	13,79
Média 7-9	Média pFBAIn-YDG2	27,32	14,41	13,38	8,05	46,23	15,16

[0195] Análises de GC demonstraram que houve um aumento significativo do total de ácidos graxos em células que conduzem pFBAIn-YDG1, quando comparado com células que conduzem pFBAIn-MOD-1. O ácido graxo médio aumentou de 21,39% FAME/DCW no controle para 23,70% FAME/DCW

em células que expressam YDGAT1 (ou seja, aumento de 10,8%). Além disso, houve também um aumento na quantidade de ácidos graxos C16:1 e C18:1 e uma redução de ácido graxo C18:2 (Tabela 4).

[0196] Células que conduzem pFBAIn-YDG2 também apresentaram um grande aumento do teor de ácido graxo total com relação ao controle, o que resulta em uma média de 27,32% FAME/DCW (que representa um aumento de 27,7%. A distribuição de espécies de ácidos graxos também foi significativamente alterada. Especificamente, a quantidade de C18:0 e C18:1 aumentou, enquanto a quantidade de C16:0, C16:1 e C18:2 foi reduzida.

[0197] Coletivamente, estes resultados demonstram que a sobreexpressão do DGAT1 ou DGAT2 de *Yarrowia lipolytica* apresenta impacto sobre o teor total de lipídios e a abundância relativa de cada espécie de ácido graxo.

EXEMPLO 4

EXPRESSÃO DE GENES DGAT DE *YARROWIA LIPOLYTICA* EM SEMENTES DE

ARABIDOPSIS:

[0198] Um vetor binário apropriado para transformação mediada por *Agrobacterium* foi gerado conforme segue. Foram adicionados diversos locais de restrição por meio de uma série de etapas de clonagem, às extremidades do conjunto Bcon/NotI/Phas3' a partir de KS123 (SEQ ID N° 21), que foi descrito anteriormente no documento WO 02/008269 (cujo conteúdo é incorporado ao presente como referência). Resumidamente, um fragmento de DNA (cal a24-4; SEQ ID N° 22) foi amplificado a partir do plasmídeo CalFad2-2 (descrito no documento WO 01/12800) utilizando os primers oCal-15 (SEQ ID N° 23) e oCal-6 (SEQ ID N° 24). O fragmento de DNA cal a24-4 (SEQ ID N° 22) foi digerido com *Bgl*II e *Bam*HI e clonado no local *Bam*HI de pKS123 para gerar pKR53B (SEQ ID N° 25). O fragmento *Xba*I/*Sbf*I de pKR53B, que contém o conjunto de Bcon/NotI/Phas3', foi clonado no fragmento *Xba*I/*Sbf*I de pKR72

(Acesso ATCC nº PTA-6019; SEQ ID Nº 26) que contém o gene higromicino fosfotransferase bacteriano, para gerar pKR85 (SEQ ID Nº 27). As características de pKR72 são as seguintes. Um plasmídeo inicial pKR72 (Acesso ATCC nº PTA-6019; SEQ ID Nº 26), um derivado de pKS123 que foi descrito anteriormente no documento WO 02/008269 (cujo teor é incorporado ao presente como referência) contém o gene higromicino B fosfotransferase (HPT) (Gritz, L. e Davies, J., *Gene* 25: 179-188 (1983)), ladeado pelo promotor T7 e término de transcrição (conjunto T7prom/hpt/T7term) e uma origem de reprodução (ori) bacteriana para seleção e reprodução em bactérias (tais como *E. coli*). Além disso, pKR72 também contém o gene higromicino B fosfotransferase, ladeado pelo promotor 35S (Odell *et al.*, *Nature* 313: 810-812 (1985)) e término de transcrição NOS 3' (Depicker *et al.*, *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 561-570 (1982)) (conjunto 35S/hpt/NOS3') para seleção em plantas tais como soja. pKR72 também contém um local de restrição *NotI*, ladeado pelo promotor para a subunidade α' de β -conglucina (Beachy *et al.*, *EMBO J.* 4: 3047-3053 (1985)) e a região de término de transcrição 3' do gene de faseolina (Doyle *et al.*, *J. Biol. Chem.* 261: 9228-9238 (1986)), de forma a permitir a expressão específica de tecido forte nas sementes de soja de genes clonados no local *NotI*.

[0199] O conjunto Bcon/*NotI*/Phas3' foi amplificado a partir do plasmídeo pKR85 (SEQ ID Nº 27) utilizando os primers oKR85-1 (SEQ ID Nº 28) e oKR85-2 (SEQ ID Nº 29) e o fragmento de DNA resultante foi clonado em PCR-Script® (Stratagene), seguindo o protocolo do fabricante, para gerar pCR85 (SEQ ID Nº 30).

[0200] O fragmento de *EcoRI*/*BglII* de pPCR85, que contém o conjunto de Bcon/*NotI*/Phas3', foi clonado no fragmento de *EcoRI*/*BamHI* do plasmídeo pZS199 (documento WO 93/11245; vide também a Patente US 5.952.544, que foi publicada em dez de junho de 1993; cujas revelações são

incorporadas ao presente como referência), que contém a cadeia principal do vetor binário de *Arabidopsis* para produzir pKR91 (SEQ ID N° 31).

[0201] O conjunto Bcon/NotI/Phas3' foi removido de pKR91 por meio de digestão com *Ascl* e foi produzido o vetor binário religado que contém um local de clonagem de *Ascl* exclusivo denominado pKR92 (SEQ ID N° 32).

CONSTRUÇÃO DE pKR92 YL DGAT2:

[0202] A construção do plasmídeo de expressão KS362 é descrita no Exemplo 5. Um conjunto de expressão que abriga o gene YL DGAT2, fundido a promotor betaconglucina e ao terminal de faseolina e gene DsRed fundido a promotor Kti e sequências de término, foi extirpado de KS362 como um fragmento de *Ascl* de 6,4 kb. Este DNA foi ligado a DNA de vetor pKR92 desfosforilado linearizado por *Ascl* para gerar pKR92 YL DGAT2 (SEQ ID N° 33).

CONSTRUÇÃO DE pKR92 YL DGAT1/YL DGAT2:

[0203] A construção do plasmídeo de expressão KS364 é descrita no Exemplo 5. Um conjunto de expressão no qual genes YL DGAT1 (SEQ ID N° 1) e YL DGAT2 (SEQ ID N° 9) são fundidos à sequência idêntica do terminal de faseolina e a promotores de glicina 1 e betaconglucina, respectivamente, foi extirpado de KS364 como um fragmento de *Ascl* de 7 kb. Este DNA foi ligado a DNA de vetor pKR92 desfosforilado linearizado por *Ascl* para gerar pKR92 YL DGAT1/YL DGAT2 (SEQ ID N° 34).

GERAÇÃO E ANÁLISE DE LINHAGENS DE *ARABIDOPSIS* TRANSGÊNICAS:

[0204] DNA de plasmídeo de pKR92 YL DGAT2 e pKR92 YL DGAT1/YL DGAT2 foi introduzido em *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (Luo *et al.*, *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14 (1): 98-103 (2001)) por meio de eletroporação. Resumidamente, 1 µg de DNA de plasmídeo foi misturado com 100 µl de células eletrocompetentes sobre gelo. A suspensão celular foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 100 µl (1 mm de largura de

espaço) e eletroporada utilizando um eletroporador BIORAD definido em 1 kV, 400 Ω e 25 μ F. As células foram transferidas para 1 ml de meio LB e incubadas por duas horas a 30 °C. As células foram colocadas em placas sobre meio LB que contém 50 μ g/ml de canamicina. As placas foram incubadas a 30 °C por sessenta horas. Cultivos de agrobactérias recombinantes (500 ml de LB, 50 μ g/ml de canamicina) foram inoculados a partir de colônias isoladas de células de agrobactérias transformadas e cultivados a 30 °C por sessenta horas. As células foram colhidas por meio de centrifugação (5000 x g, 10 min) e novamente suspensas em um litro de sacarose a 5% (peso/volume) contendo 0,05% (v/v) Silwet. As plantas de *Arabidopsis* foram cultivadas em solo a uma densidade de trinta plantas por vaso de 100 cm² em mistura de solo metromix 360 por quatro semanas (22 °C, luz permanente, 100 μ E m⁻²s⁻¹). As plantas foram mergulhadas repetidamente na suspensão de *Agrobacterium* que abriga os vetores binários e mantidas em um ambiente escuro com alta umidade por 24 horas. As plantas foram cultivadas por quatro a cinco semanas sob condições de crescimento de plantas padrão descritas acima e material de planta foi colhido e seco por uma semana sob temperaturas ambiente em sacos de papel. As sementes foram colhidas utilizando uma peneira de latão com mesh de 0,425 mm.

[0205] Sementes de *Arabidopsis* limpas (2 g, correspondentes a cerca de cem mil sementes) foram esterilizadas por meio de lavagens em 45 ml de etanol a 80%, 0,01% Triton X-100, seguidos por 45 ml de 30% (v/v) alvejante doméstico em água, 0,01% Triton X-100 e, finalmente, por meio de enxágue repetido em água estéril. Parcelas de 20.000 sementes foram transferidas para placas quadradas (20 x 20 cm) que contêm 150 ml de meio de crescimento de plantas estéril composto de 0,5 x sais MS, 1,0% (p/v) sacarose, 0,05 MES/KOH (pH 5,8), 200 μ g/ml de timentina e 50 μ g/ml de canamicina solidificada com 10 g/l de Agar. Dispersão homogênea da semente

sobre o meio foi facilitada por meio de mistura da suspensão de sementes aquosa com um volume igual de meio de crescimento de plantas fundido. Placas foram incubadas sob condições de crescimento padrão por dez dias. Mudanças resistentes a canamicina foram transferidas para meio de crescimento de plantas sem agente seletivo e cultivadas até a maturidade por oito a dez semanas (22 °C, luz permanente escura, 100 a 200 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$). As plantas foram cultivadas em placas planas com 36 insertos. Em cada placa plana, pelo menos seis plantas controle do tipo selvagem não transformadas foram cultivadas perto de cerca de trinta plantas T2. As sementes foram colhidas de plantas individuais e o teor de óleo de semente foi medido por meio de NMR.

ANÁLISE DO TEOR DE ÓLEO DE SEMENTE COM BASE EM NMR:

[0206] O teor de óleo de semente foi determinado utilizando um analisador NMR Ultra Maran (Resonance Instruments Ltd., Whitney, Oxfordshire, Reino Unido). Amostras (sementes de soja individuais ou lotes de sementes de *Arabidopsis* cujo peso varia de 5 a 200 mg) foram colocadas em tubos de polipropileno de 2 ml previamente pesados (Corning Inc., Corning NY, Estados Unidos; Parte nº 430917) marcados anteriormente com identificadores de códigos de barra exclusivos. As amostras foram colocadas em seguida em 96 veículos de placas e processadas ao longo da série de etapas a seguir por um sistema robótico Adept Cobra 600 SCARA:

1. Pegar tubo (o braço robótico foi equipado com um dispositivo de tomada a vácuo).
2. Ler código de barras.
3. Expor tubo a dispositivo antiestático (garantindo que a semente de *Arabidopsis* não se aderisse às paredes do tubo).
4. Pesar o tubo (que contém a amostra) até precisão de 0,0001 g.
5. Leitura de NMR; medido como a intensidade do eco de

centrifugação de prótons um milissegundo após a aplicação de um sinal de 22,95 MHz à amostra (os dados foram recolhidos para 32 varrimentos de NMR por amostra).

6. Devolver o tubo para a prateleira.
7. Repetir o processo com o tubo seguinte.

[0207] Códigos de barras, pesos de tubos e leituras de NMR foram registrados por um computador conectado ao sistema. O peso da amostra foi determinado subtraindo-se o peso do tubo de polipropileno do peso do tubo que contém a amostra.

[0208] O teor de óleo de sementes de soja foi calculado conforme segue:

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

[0209] Os parâmetros de calibragem foram determinados por meio de pesagem precisa de amostras de óleo de soja (que variam de 0,0050 a 0,0700 g em intervalos de cerca de 0,0050 g; pesadas até uma precisão de 0,0001 g) em tubos Corning (vide acima) e submetendo-as a análise de NMR. Foi estabelecida uma curva de calibragem de teor de óleo (base % em peso de semente; considerando um peso de semente padrão de 0,1500 g) por valor de NMR.

[0210] A relação entre os teores de óleo de sementes medidos por meio de NMR e os teores de óleo absolutos medidos por meio de métodos de química analítica clássicos foi determinada conforme segue. Cinquenta sementes de soja, selecionadas por possuírem uma faixa de conteúdos de óleo, foram secas a 40 °C em um forno a ar forçado por 48 horas. Sementes individuais foram submetidas a análise de NMR, conforme descrito acima, e foram moídas em seguida em um pó fino em um moedor Geno (SPEX Centripep (Metuchen, NJ, Estados Unidos); 1500 oscilações por minuto, por um

minuto). Parcelas de 70 a 100 mg foram pesadas (até precisão de 0,0001 g) em 13 tubos de vidro de 100 mm equipados com tampas de rosca forradas de Teflon®; o restante do pó de cada grão foi utilizado para determinar o teor de umidade, por meio de diferença de peso após dezoito horas em um forno a ar forçado a 105 °C. Adicionou-se heptano (3 ml) aos pós nos tubos e após a extração das amostras misturadas por turbilhonamento sobre um agitador entre extremidades por uma hora à temperatura ambiente. Os extratos foram centrifugados, 1500 x g por dez minutos, o sobrenadante foi decantado em um tubo limpo e as pelotas foram extraídas mais duas vezes (uma hora cada) com 1 ml de heptano. Os sobrenadantes das três extrações foram combinados e adicionou-se 50 µl de padrão interno (ácido tri-heptadecanoico; 10 mg/ml de tolueno) antes da evaporação até secar à temperatura ambiente sob um fluxo de gás nitrogênio; padrões contendo 0, 0,0050, 0,0100, 0,0150, 0,0200 e 0,0300 g de óleo de soja, em 5 ml de heptano, foram preparados da mesma forma. Gorduras foram convertidas em metil ésteres de ácido graxo (FAMES) por meio da adição de 1 ml de ácido sulfúrico a 5% (v:v em metanol anidro) às pelotas secas e seu aquecimento a 80 °C por trinta minutos, com mistura por turbilhonamento ocasional. As amostras foram mantidas em resfriamento à temperatura ambiente e adicionou-se 1 ml de cloreto de sódio aquoso a 25%, seguido por 0,8 ml de heptano. Após mistura por turbilhonamento, as fases foram mantidas em separação e a fase orgânica superior foi transferida para uma ampola de amostra e submetida a análise por GC.

[0211] A plotagem de teores de óleo determinados por meio de NMR contra teores de óleo determinados por meio de GC resultou em uma relação linear de 9,66 a 26,27% de óleo (valores GC; base % em peso de semente) com inclinação de 1,0225 e R² de 0,9744; com base em um teor de umidade de semente médio de 2,6 +/- 0,8%.

O TEOR DE ÓLEO DE SEMENTES DE *ARABIDOPSIS* FOI CALCULADO CONFORME

SEGUE:

$$\text{mg de óleo} = (\text{sinal de NMR} - 2,1112)/37,514$$

$$\% \text{ óleo (base \% em peso)} = (\text{mg óleo}/1000)/\text{peso da amostra} * 100$$

[0212] Antes do estabelecimento desta fórmula, o óleo de semente de *Arabidopsis* foi extraído conforme segue. Cerca de 5 g de sementes de *Arabidopsis* maduras (cv Columbia) foram moídos em um pó fino utilizando pilão e almofariz. O pó foi colocado em um dedal de papel de 33 x 94 mm (Ahlstrom nº 7100-3394; Ahlstrom, Mount Holly Springs PA, Estados Unidos) e o óleo extraído durante cerca de quarenta ciclos de extração com éter de petróleo (ponto de ebulição 39,9 a 51,7 °C) em um aparelho Soxhlet. O extrato foi mantido em resfriamento e o óleo bruto foi recuperado removendo-se o solvente a vácuo em um evaporador giratório. Os parâmetros de calibragem foram determinados pesando-se precisamente onze amostras padrão de óleo de *Arabidopsis* parcialmente purificado (as amostras continham 3,6, 6,3, 7,9, 9,6, 12,8, 16,3, 20,3, 28,2, 32,1, 39,9 e 60 mg de óleo de *Arabidopsis* parcialmente purificado) pesado até uma precisão de 0,0001 g) em tubos de polipropileno de 2 ml (Corning Inc., Corning NY, Estados Unidos; parte nº 430917) e submetendo-os a análise de NMR. Foi estabelecida uma curva de calibragem entre teor de óleo (base % em peso de semente) e valor de NMR.

[0213] Sementes de pKR92 YL DGAT2 T2 foram cultivadas a partir de um total de 293 eventos independentes ao lado de 75 controles do tipo selvagem. O teor de óleo de transgênicos YL DGAT2 variou de 27,9 a 47,3%. O teor médio de óleo foi de 43,7%. O teor de óleo de controles de tipo selvagem variou de 39,5 a 49,6%. O teor médio de óleo de controles em peso foi de 44,8%.

[0214] Sementes de pKR92 YL DGAT1/YL DGAT2 T2 foram

cultivadas a partir de um total de 295 eventos independentes ao longo de 77 controles do tipo selvagem. O teor de óleo de transgênicos YL DGAT1/YL DGAT2 variou de 34,5 a 47,6%. O teor médio de óleo foi de 44%. O teor de óleo de controles do tipo selvagem variou de 41,3 a 46,6%. O teor médio de óleo de controles do tipo selvagem foi de 45%. Resumidamente, essas descobertas sugerem que a expressão específica de sementes de gene YL DGAT não aumenta o teor de óleo de sementes de *Arabidopsis*.

ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE SEMENTES DE ARABIDOPSIS QUE EXPRESSAM YL DGAT2 ISOLADAMENTE OU EM COMBINAÇÃO COM YL DGAT1:

[0215] Análise GC de FAME foi empregada para investigar se a expressão de YL DGAT altera o perfil de ácidos graxos de sementes de *Arabidopsis*. Cerca de cem sementes F2 foram liberadas em cavidades individuais de 96 tubos bem riscados.

[0216] Para transesterificação, 50 µl de hidróxido de trimetilsulfônio (TMSH) e 0,5 ml de hexano foram adicionados a cada tubo riscado e incubados por trinta minutos à temperatura ambiente mediante agitação. Metil ésteres de ácidos graxos (1 µl injetado a partir de camada de hexano) foram separados e quantificados utilizando um Cromatógrafo de Gases Hewlett-Packard 6890 equipado com uma coluna capilar de sílica fundida Omegawax 320 (Catálogo nº 24152, Supelco Inc.).

[0217] A temperatura do forno foi programada para manter-se a 220 °C por 2,6 minutos, aumentar para 240 °C a 20 °C/minuto e manter-se em seguida por 2,4 minutos adicionais. Gás veículo foi fornecido por um gerador de hidrogênio Whatman.

[0218] Os tempos de retenção foram comparados com os de metil ésteres de padrões disponíveis comercialmente (Nu-Chek Prep, Inc.). Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 5.

TABELA 5

	% oleico médio	% oleico faixa
pKR92 YL DGAT1/YL DGAT2 (n = 28)	18,7	15,2 – 22,3
controle do tipo selvagem (n = 8)	15,2	14,5 – 15,6
pKR92 YL DGAT2 (n = 26)	16,4	14,9 – 18,4
Controle de tipo selvagem (n = 7)	15,7	15,6 – 16

[0219] Os resultados demonstram claramente que a expressão de YL DAGT2 e, ainda mais, a coexpressão de YL DGAT1 e YL DGAT2 em sementes de *Arabidopsis* gera aumento da incorporação de ácido oleico em lipídios de sementes que fornece a primeira indicação de que proteínas YL DGAT1 e YL DGAT2 ativas podem ser produzidas em sementes transgênicas.

EXEMPLO 5**EXPRESSÃO DE GENES DGAT DE *YARROWIA LIPOLYTICA* EM EMBRIÕES SOMÁTICOS****DE SOJA:**

[0220] A Tabela 6 e a Tabela 7 relacionam sequências promotoras e de término que foram utilizadas em construções de plasmídeos para sobreexpressão específica de sementes de genes YL DGAT.

TABELA 6**PROMOTORES ESPECÍFICOS DE SEMENTES**

Promotor	Organismo	Referência de promotor
Subunidade α' de β -conglucina	soja	Beachy <i>et al.</i> , <i>EMBO J.</i> 4: 3047-3053 (1985)
Inibidor de tripsina de kunitz	soja	Jofuku <i>et al.</i> , <i>Plant Cell</i> 1: 1079-1093 (1989)
glicina Gy1	soja	WO 2004/071467
BD30 (também denominado P34)	soja	WO 2004/071467

TABELA 7**TÉRMINOS DE TRANSCRIÇÃO**

Término de transcrição	Organismo	Referência
faseolina 3'	feijão	WO 2004/071467
inibidor de tripsina kunitz 3'	soja	WO 2004/071467

[0221] Elaboração de uma construção de plasmídeo para expressão do gene YL DGAT1 sob controle do promotor Gy1 de glicinina (KS349) (Figura 3).

[0222] O isolamento do promotor Gy1 de glicinina de soja foi realizado conforme segue. Com base nas sequências da sequência de gene Gy1 de glicinina de soja (Acesso GenBank nº X15121; SEQ ID Nº 35) no banco de dados NCBI, dois oligos com locais *Bam*HI ou *Nco*I nas extremidades 5' foram projetados para amplificar o promotor Gy1 de glicinina de soja (SEQ ID Nº 36). As sequências de oligonucleotídeos desses dois oligos são as sequências:

SEQ ID Nº 37 (oGy1-1):

CGCGGATCCTAGCCTAAGTACGTACTCAAATGCCA

SEQ ID Nº 38 (oGy1-2):

GAATTCCCATGGGGTGATGACTGATGAGTGTTTAAGGAC

[0223] O plasmídeo pKS349 foi construído em várias etapas a partir de uma série de diferentes vetores intermediários. O fragmento promotor de Gy1 glicinina de soja amplificado foi digerido com *Bam*HI e *Nco*I, purificado e clonado nos locais *Bam*HI e *Nco*I de p24K-G4G-@Sall (Pedido PCT nº WO 98/59062) para gerar pZBL114 (SEQ ID Nº 39). O fragmento de *Nco*I/*Kpn*I que contém GUS foi substituído por um fragmento de *Nco*I/*Kpn*I que contém um produto de fusão do gene GY1 de soja (SEQ ID Nº 40) e o gene de alta lisina de cevada sintética 8 (BHL8) (US 6.800.726 B1) (SEQ ID Nº 41) para elaborar pZBL133 (SEQ ID Nº 43). A sequência de DNA do produto de fusão de gene

GY1 de soja e gene BHL8 é definida como SEQ ID Nº 42. O terminal de faseolina foi removido de pZBL133 (*Xba*I/preenchido) e substituído com o terminal de faseolina encontrado em pKS123 (Pedido PCT nº WO 02/08269 (obtus) para gerar pKS238 (SEQ ID Nº 44). A fusão de GY1-BHL8 foi substituída com sequência GY1 nativa conforme segue. pKS238 foi digerido com *Kpn*I/*Bgl*II e a faixa de vetor remanescente (5,1 kb) foi ligada a um fragmento de DNA (*Bgl*II/*Kpn*I) do gene GY1 nativo (SEQ ID Nº 40) para gerar pKS240 (SEQ ID Nº 45). O fragmento de *Bam*HI/*Sal*I que contém Gy1/GM-GY1/Phas3' foi extirpado de pKS 240 e ligado aos locais *Bam*HI/*Sal*I de pKS120 (SEQ ID Nº 46) para gerar pKS242 (SEQ ID Nº 47).

[0224] O plasmídeo pKS120 é idêntico a pKS123 (acima), com exceção da remoção do fragmento de *Hind*III que contém conjunto Bcon/*Not*I/Phas3'. O fragmento de *Nco*I/*Not*I que contém GM-GY1 foi substituído pelo fragmento de *Nco*I/*Not*I que contém YL-DGAT1 de pYDA1 para gerar pKS349 (SEQ ID Nº 48).

ELABORAÇÃO DE UMA CONSTRUÇÃO PARA EXPRESSÃO DO GENE YL DGAT2 SOB O CONTROLE DO PROMOTOR DE BETA CONGLICININA (KS362) (FIGURA 3):

[0225] O plasmídeo pKS362 foi construído em diversas etapas a partir de uma série de diferentes vetores intermediários. O conjunto de *Asc*I que contém *Kti*/*Not*I/*Kti*3' de pKS121 (Pedido PCT nº WO 02/00904) foi moderado no local *Not*I (preenchido) em pBluescript II SK+ (Stratagene) para gerar pKS121/BS. O fragmento *Nco*I/*Not*I de pDsRed-Express Vector (Clontech) foi moderado no local *Not*I (preenchido) de pKS121/BS para gerar pDS-RED em KS121/BS (SEQ ID Nº 49). O conjunto de *Bam*HI que contém *Kti*/DsRed/*Kti*3' em PDS-RED em KS121/BS (SEQ ID Nº 50) foi ligado no local *Bam*HI de pKS123 (Pedido PCT nº WO 02/08269) para gerar pKS332 (SEQ ID Nº 51). O gene para o YL-DGAT2 foi sintetizado por meio de PCR com primers para introduzir locais *Not*I nas duas extremidades do gene (vide Exemplo 1). O

produto de PCR resultante é digerido com enzima de restrição *NotI* e ligado ao local *NotI* de pKS332 para gerar pKS362 (SEQ ID N° 52).

CONSTRUÇÃO DE UM PLASMÍDEO CONTROLE (KS352) (FIGURA 2):

[0226] Com base nas sequências do promotor P34 de soja clonado (WO 2004/071467) (SEQ ID N° 53), dois oligos com locais *Bam*HI ou *NotI* nas extremidades 5' foram projetados para amplificar novamente o promotor P34. As sequências de oligonucleotídeos desses dois oligos são exibidas conforme segue:

SEQ ID N° 54 (oP34-1):

CGCGGATCCAACTAAAAAAGCTCTCAAATTACATTTTGAG

SEQ ID N° 55 (oP34-2):

GAATTCGCGGCCGCAACTTGGTGAAGAATTTTATGATTTGAAA

[0227] O fragmento promotor de P34 reamplificado foi digerido com *Bam*HI e *NotI*, purificado e clonado nos locais *Bam*HI e *NotI* do plasmídeo pZBL115 (SEQ ID N° 56) para elaborar pJS89 (SEQ ID N° 57). O plasmídeo pZBL115 contém a origem de reprodução de pRB322, o gene de resistência à higromicina HPT bacteriana dirigido pelo promotor T7 e terminal T7 e um gene promotor 35S-HPT-Nos3' para servir de marcador de seleção de plantas resistentes à higromicina. O gene delta-6 dessaturase de *Mortierella alpina* (Patente US 5.968.809) (SEQ ID N° 58) foi clonado no local *NotI* de pJS89 (SEQ ID N° 57) na orientação com sentido para elaborar os conjuntos de expressão vegetal e pJS93 (SEQ ID N° 59).

[0228] O promotor de P34 foi extirpado de pJS93 (SEQ ID N° 59) utilizando digestão dupla de *SalI* *NotI* e ligado a vetor pKS127 linearizado *SalI/NotI* (Pedido de Patente US 11/476.510) (SEQ ID N° 60) para gerar pKS343 (SEQ ID N° 61). O conjunto *Bam*HI que contém Kti/DsRed/Kti3' em pDS-RED em KS121/BS foi moderado e ligado ao local *HindIII* (preenchido) de pKS343 para gerar pKS352 (SEQ ID N° 62).

CONSTRUÇÃO DE UM PLASMÍDEO PARA COEXPRESSIONO DE YL DGAT1 E YL DGAT2**(KS364):**

[0229] O plasmídeo pKS364 (SEQ ID Nº 63) foi construído ligando-se o conjunto *HindIII* de 3,3 kb que contém Bcongl PRO/YL-DGAT2/Phas TER de pKS362 (SEQ ID Nº 52) ao local *HindIII* exclusivo abaixo no fluxo do promotor Gy1 em pKS349 (SEQ ID Nº 48).

GERAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS TRANSGÊNICOS:

[0230] Para coexpressão de gene YL DGAT1 e YL DGAT2 em embriões somáticos de soja, tecido de soja foi cobombardeado conforme descrito abaixo com uma mistura de KS349 e KS362. Resumidamente, DNA de KS349 foi digerido com enzimas de restrição *PstI*, *XhoI* para desativar o conjunto de gene marcador selecionável (CaMV35S PRO/HPT/CaMV NOS TER). Este DNA foi misturado em uma razão 10:1 com DNA de plasmídeo linearizado com *SalI* de KS362 e utilizado para transformação de soja conforme descrito abaixo. Alternativamente, tecido de soja de embriões somáticos de soja foi bombardeado conforme descrito abaixo com DNA de plasmídeo intacto de KS364 que contém conjuntos de expressão funcional para ambos, YL DGAT1 e YL DGAT2. Para expressão de YL DGAT1 isoladamente, DNA de plasmídeo não cortado de KS349 foi utilizado para bombardeamento de partículas de tecido de embriões. De forma similar, para expressão de YL DGAT2 isoladamente, DNA de plasmídeo não cortado de KS362 foi utilizado para bombardeamento de partículas de tecido de embrião. Além disso, DNA que continha apenas um marcador selecionável (KS352) foi utilizado para transformação de tecido de soja de forma idêntica.

CONDIÇÕES DE CULTIVO:

[0231] Cultivos de suspensão embriogênica de soja (cv. Jack) foram mantidos em 35 ml de meio líquido SB196 (abaixo) sobre um agitador giratório, 150 rpm, 26 °C com luzes fluorescentes brancas frias em um

fotoperíodo de 16:8 h de dia/luz sob intensidade de luz de 60 a 85 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Os cultivos foram subcultivados a cada sete dias a duas semanas por meio de inoculação de cerca de 35 mg de tecido em 35 ml de SB196 líquido novo (o intervalo de subcultivo preferido é a cada sete dias).

[0232] Cultivos de suspensão embriogênica de soja foram transformados com os plasmídeos de expressão de soja por meio do método de bombardeamento de disparador de partículas (Klein *et al.*, *Nature* 327: 70 (1987)) utilizando um instrumento DuPont Biolistic PDS1000/HE (retroajuste de hélio) para todas as transformações.

INÍCIO DE CULTIVO DE SUSPENSÃO EMBRIOGÊNICA DE SOJA:

[0233] Cultivos de soja foram iniciados duas vezes a cada mês com cinco a sete dias entre cada início. Vagens com sementes imaturas de plantas de soja disponíveis 45 a 55 dias após o plantio foram picadas, removidas das suas cascas e colocadas em uma caixa magenta esterilizada. As sementes de soja foram esterilizadas por meio de sua agitação por quinze minutos em uma solução de Clorox a 5% com uma gota de sabão em barra (ou seja, 95 ml de água destilada em autoclave mais 5 ml de Clorox e uma gota de sabão, bem misturados). As sementes foram enxaguadas utilizando duas garrafas de um litro de água destilada estéril e as com menos de 4 mm foram colocadas sobre lâminas de microscópio individuais.

[0234] A extremidade pequena da semente foi cortada e os cotilédones foram prensados para fora do revestimento de semente. Os cotilédones foram transferidos para placas contendo meio SB199 (25 a 30 cotilédones por placa) por duas semanas e transferidos em seguida para SB1 por duas a quatro semanas. As placas foram embaladas com fita de fibra. Após este período, embriões secundários foram cortados e colocados em meios líquidos SB196 por sete dias.

PREPARAÇÃO DE DNA PARA BOMBARDEAMENTO:

[0235] Um plasmídeo intacto ou um fragmento de plasmídeo de DNA que contém os genes de interesse e o gene marcador selecionável foram utilizados para bombardeamento.

[0236] Uma parcela de 50 µl de água destilada estéril contendo 1 mg de partículas de ouro foi adicionada a 5 µl de uma solução de 1 µg/µl de DNA (seja plasmídeo intacto ou fragmento de DNA preparado conforme descrito acima), 50 µl de 2,5 M CaCl₂ e 20 µl de 0,1 M espermidina. A mistura foi pulsada por cinco vezes sobre o nível 4 de um agitador por turbilhonamento e centrifugada por cinco segundos em um microcentrifugador de bancada. Após lavagem com 150 µl de etanol a 100%, a pelota foi suspensa por meio de sonicação em 85 µl de etanol a 100%. Cinco microlitros de suspensão de DNA foram liberados para cada disco flutuante do instrumento Biolistic PDS1000/HE. Cada parcela de 5 µl continha cerca de 0,058 mg de partículas de ouro por bombardeamento (ou seja, por disco).

PREPARAÇÃO DE TECIDOS E BOMBARDEAMENTO COM DNA:

[0237] Cerca de 100 a 150 mg de cultivos de suspensão embrionária com sete dias de idade foram colocados em uma placa de petri de 60 x 15 mm estéril vazia e a placa foi colocada no interior de uma placa de petri 150 x 25 mm vazia. O tecido foi bombardeado uma vez por placa com pressão de ruptura de membrana definida a 650 PSI e a câmara foi evacuada até um vácuo de 680 a 710 mm de mercúrio. O tecido foi colocado a cerca de 6,3 cm da tela de retenção/parada.

SELEÇÃO DE EMBRIÕES TRANSFORMADOS:

[0238] Embriões transformados foram selecionados utilizando higromicina como o marcador selecionável. Especificamente, após o bombardeamento, o tecido foi colocado em meio SB196 novo e cultivado

conforme descrito acima. Seis a oito dias após o bombardeamento, o SB196 é substituído por SB196 novo contendo 30 mg/l de higromicina. O meio de seleção foi renovado semanalmente. Quatro a seis semanas após a seleção, observou-se o crescimento de tecido transformado verde a partir de conjuntos embriogênicos necróticos não transformados. Tecido verde isolado foi removido e inoculado em placas com múltiplas cavidades para gerar novos cultivos de suspensão embriogênica transformados e propagados de forma clonal.

MATURAÇÃO DOS EMBRIÕES:

[0239] Conjuntos embriogênicos transformados foram cultivados por uma a três semanas a 26 °C em SB196 sob lâmpadas fluorescentes brancas frias (Econowatt branca fria da Philips F40/CW/RS/EW) e Agro (Philips F40 Agro) (40 watts) em um fotoperíodo de 16:8 horas com intensidade de luz de 90 a 120 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$. Após este período, os conjuntos de embriões foram removidos para um meio Agar sólido, SB166, por uma semana. Em seguida, foram subcultivados para meio SB103 por três semanas. Alternativamente, os conjuntos de embriões foram removidos para meios líquidos SB228 (SHaM), 35 ml em frasco Erlenmeyer de 250 ml, por duas a três semanas. Tecido cultivado em SB228 foi mantido sobre um agitador giratório, 130 rpm, 26 °C com luzes fluorescentes brancas frias em um fotoperíodo de 16:8 horas de dia/luz sob intensidade de luz de 60 a 85 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$. Durante este período, embriões individuais foram removidos dos conjuntos e selecionados para determinar alterações das suas composições de ácidos graxos conforme descrito acima.

[0240] Receitas de meios:

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

Ms FeEDTA – 100x Padrão 1	10 ml
MS Sulfato – 100x Padrão 2	10 ml
FN Lite Haletos – 100x Padrão 3	10 ml

FN Lite P, B, Mo – 100x Padrão 4	10 ml
Vitaminas B5 (1 ml/l)	1,0 ml
2,4-D (concentração final de 10 mg/l)	1,0 ml
KNO ₃	2,83 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,463 g
asparagina	1,0 g
sacarose (1%)	10 g
pH 5,8	

SOLUÇÕES PADRÃO FN LITE:

Número de padrão		1000 ml	500 ml
1	MS Fe EDTA 100x padrão		
	Na ₂ EDTA *	3,724 g	1,862 g
	FeSO ₄ – 7H ₂ O	2,784 g	1,392 g
* Agregar primeiro, dissolver em garrafa escura mediante agitação.			
2	MS Sulfato 100x padrão		
	MgSO ₄ – 7H ₂ O	37,0 g	18,5 g
	MnSO ₄ – H ₂ O	1,69 g	0,845 g
	ZnSO ₄ – 7H ₂ O	0,86 g	0,43 g
	CuSO ₄ – 5H ₂ O	0,0025 g	0,00125 g
3	FN Lite haletos 100x padrão		
	CaCl ₂ – 2H ₂ O	30,0 g	15,0 g
	KI	0,083 g	0,0715 g
	CoCl ₂ – 6H ₂ O	0,0025 g	0,00125 g

Número de padrão		1000 ml	500 ml
4	FN Lite P, B, Mo 100x padrão		
	KH ₂ PO ₄	18,5 g	9,25 g
	H ₃ BO ₃	0,62 g	0,31 g
	Na ₂ MoO ₄ – 2H ₂ O	0,025 g	0,0125 g

MEIO SÓLIDO SB1 (POR LITRO):

[0241] 1 pacote de sais MS (Gibco/BRL – Cat. Nº 11117-066)

[0242] 1 ml de vitaminas B5 1000X padrão

[0243] 31,5 g de glicose

[0244] 2 ml de 2,4-D (20 mg/l de concentração final)

[0245] pH 5,7

[0246] 8 g de TC ágar

MEIO SÓLIDO SB199 (POR LITRO):

[0247] 1 pacote de sais MS (Gibco/BRL – Cat. nº 11117-066)

[0248] 1 ml de vitaminas B5 1000X padrão

[0249] 30 g de sacarose

[0250] 4 ml de 2,4-D (concentração final de 40 mg/l)

[0251] pH 7,0

[0252] 2 g de gelrita

MEIO SÓLIDO SB 166 (POR LITRO):

[0253] 1 pacote de sais MS (Gibco/BRL – Cat. Nº 11117-066)

[0254] 1 ml de vitaminas B5 1000X padrão

[0255] 60 g de maltose

[0256] 750 mg de MgCl₂ hexa-hidrato

[0257] 5 g de carvão ativado

[0258] pH 5,7

[0259] 2 g de gelrita

MEIO SÓLIDO SB 103 (POR LITRO):

[0260] 1 pacote de sais MS (Gibco/BRL – Cat. Nº 11117-066)

[0261] 1 ml de vitaminas B5 1000X padrão

[0262] 60 g de maltose

[0263] 750 mg de MgCl₂ hexa-hidrato

[0264] pH 5,7

[0265] 2 g de gelrita

MEIO SÓLIDO SB 71-4 (POR LITRO):

[0266] 1 garrafa de sais B5 de Gamborg com sacarose
(Gibco/BRL – cat. Nº 21153-036)

[0267] pH 5,7

[0268] 5 g de TC Agar

PADRÃO 2,4-D:

[0269] Obter pré-fabricado da Phytotech Cat. No. D 295 –
concentração de 1 mg/ml.

VITAMINAS B5 PADRÃO (POR 100 ML):

[0270] Armazenar parcelas a -20 °C:

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

[0271] Caso a solução não se dissolva com rapidez suficiente,
aplicar um nível baixo de calor por meio da placa sob agitação quente.

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

H ₂ O DDI	600 ml
Sais FN-Lite Macro para SHaM 10X	100 ml

Sais MS Micro 1000x	1 ml
MS FeEDTA 100x	10 ml
CaCl 100x	6,82 ml
Vitaminas B5 1000x	1 ml
L-metionina	0,149 g
Sacarose	30 g
Sorbitol	30 g

[0272] Ajustar volume para 900 ml.

[0273] pH 5,8

[0274] Autoclave

[0275] Adicionar a meios resfriados ($\leq 30^{\circ}\text{C}$):

*Glutamina (concentração final de 30 mM) 4%: 110 ml.

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

[0276] Como glutamina degrada-se com relativa rapidez, pode ser preferível a adição imediata antes do uso dos meios. A validade é de duas semanas após a adição de glutamina; os meios base podem ser mantidos por mais tempo sem glutamina.

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

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

[0277] Trazer para o volume

[0278] Autoclave

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

H ₃ BO ₃ (ácido bórico)	6,2 g
MnSO ₄ *H ₂ O (mono-hidrato sulfato de manganês)	16,9 g
ZnSO ₄ *7H ₂ O (hepta-hidrato sulfato de zinco)	8,6 g
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O (di-hidrato molibdato de sódio)	0,25 g
CuSO ₄ *5H ₂ O (penta-hidrato sulfato de cobre)	0,025 g
CoCl ₂ *6H ₂ O (hexa-hidrato cloreto de cobalto)	0,025 g
KI (iodeto de potássio)	0,8300 g

[0279] Trazer para o volume

[0280] Autoclave

FEEDTA 100X – ESTOQUE Nº 3 (POR LITRO):

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

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

[0281] Trazer para o volume

[0282] A solução é fotossensível. A(s) garrafa(s) deverá(ão) ser embalada(s) em folha metálica para omissão de luz.

[0283] Autoclave

CA 100X – ESTOQUE Nº 4 (POR LITRO):

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

cálcio)	
---------	--

[0284] Trazer para volume

[0285] Autoclave

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

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

[0286] Trazer para volume

[0287] Armazenar congelado

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

Água DDI aquecida a 30 °C	900 ml
L-Glutamina	40 g

[0288] Adicionar gradualmente mediante agitação e aplicação de baixo calor.

[0289] Não exceder 35 °C.

[0290] Trazer para volume

[0291] Filtrar e esterilizar

[0292] Armazenar congelado*

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

ANÁLISE DE ÓLEO:

[0293] Embriões somáticos foram colhidos após duas semanas de cultivo no meio de maturação líquido SB228 (SHaM). Cerca de trinta eventos foram criados em transformações com KS352, KS349/KS362 e KS362 e KS364. Todos os embriões gerados para um dado evento foram colhidos a

granel e processados conforme segue. Os embriões foram congelados sobre gelo seco ou por meio de incubação em um congelador a -80°C por duas horas, seguida por liofilização por 48 horas.

[0294] Embriões secos foram moídos até um pó fino utilizando uma ampola de moedor Geno (1/2"x2" policarbonato) e uma bola de aço (SPEX Centriprep (Metuchen NJ, Estados Unidos). O tempo de moagem foi de trinta segundos a 1450 oscilações por minuto. Para cada evento, triplicatas de cerca de 10 mg de tecido foram pesadas em tubos Eppendorf. O tecido foi extraído utilizando 200 μl de heptano à temperatura ambiente sob agitação contínua por duas horas. Extratos de heptano foram limpos por meio de centrifugação e 25 μl de extrato foram derivados em metil ésteres de ácidos graxos conforme segue. Um mililitro de uma solução padrão de metóxido de sódio a 25% foi adicionado a 24 ml de metanol em grau de HPLC. Metóxido de sódio foi armazenado sob gás inerte.

[0295] Cinco microlitros de uma solução padrão de 17:0 TAG (Nu-Chek Prep, Elysian MN, Estados Unidos) (10 mg/ml) foram combinados com 25 μl de extrato de tecido de heptano em um tubo de cultivo de vidro e adicionou-se 500 μl de metóxido de sódio a 1%. Amostra foi derivada em um banho de água a 50°C por quinze minutos. Amostras foram mantidas em resfriamento à temperatura ambiente e 1 ml de 1 M NaCl foi adicionado seguido por mistura rápida. FAMES foram extraídos em 1 ml de heptano e 4 μl de amostra foram quantificados por meio de análise de GC.

[0296] Realizou-se análise de dados por meio de plotagem do teor de oleico (% de FAME total) contra o teor total de FAME (% DW). A Tabela 8 demonstra que embriões somáticos gerados com um vetor controle (KS352) exibem pouca flutuação no teor de ácido oleico e alguma flutuação no teor de óleo que pode muito provavelmente ser atribuído a variações biológicas introduzidas no processo de regeneração. Embriões muito provavelmente

exibem, por exemplo, variação no seu estágio de desenvolvimento no momento da colheita. Em embriões gerados com a construção de controle, não foi observada correlação ($R^2 = 0,1142$) entre o teor de ácido oleico e o teor de óleo (Tabela 8). Em embriões gerados com construções de plasmídeos que expressam genes YL DGAT1 e YL DGAT2 isoladamente, KS349 e KS362, respectivamente, ou ambos os genes YL DGAT1 e DGAT2 (KS349/KS362, KS364) sob controle de promotores específicos de sementes fortes, tanto o teor de ácido oleico quanto o teor de ácido graxo total esterificado exibiram uma ampla variação de flutuação. Além disso, conforme exibido nas Figuras 4 e 5, foi observada uma forte correlação ($R^2 \geq 0,59$) entre o teor de ácido oleico e o teor de ácido graxo esterificado total para embriões somáticos gerados com KS349 e KS362 isoladamente ou em combinações, bem como com KS364, um plasmídeo de transformação que contém conjuntos de expressão para genes YL DGAT1 e YL DGAT2.

TABELA 8**TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS ESTERIFICADOS E ÁCIDO OLEICO DE EMBRIÕES****SOMÁTICOS DE SOJA**

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

Evento nº	KS 352 FAME (% DCW)	Desvio Padrão	Ácido oleico (% FAME total)
68	5,3	nd	18,6
3	5,2	nd	18,5
4	5,2	nd	18,9
11	5,2	nd	19,1
41	5,2	nd	16,9
51	5,2	nd	18,2
7	5,1	nd	17,2
10	5,1	nd	19,9
21	5,1	nd	18,2
27	5,1	nd	18,3
1	5,0	nd	17,6
46	5,0	nd	18,4
59	5,0	nd	17,5
66	5,0	nd	19,3
5	4,9	nd	15,1
15	4,9	nd	15,7
29	4,9	nd	16,5
2	4,8	nd	17,6
9	4,8	nd	17,4
30	4,8	nd	17,0
34	4,8	nd	16,9
19	4,7	nd	14,8
47	4,7	nd	17,4
67	4,7	nd	22,9
13	4,6	nd	17,2

Evento nº	KS 352 FAME (% DCW)	Desvio Padrão	Ácido oleico (% FAME total)
28	4,6	nd	15,9
39	4,6	nd	18,6
44	4,6	nd	17,1
65	4,6	nd	19,4
6	4,5	nd	13,9
24	4,5	nd	16,1
31	4,5	nd	15,9
20	4,4	nd	17,1
37	4,4	nd	17,3
69	4,4	nd	19,2
50	4,3	nd	17,2
54	4,3	nd	19,5
55	4,3	nd	16,1
64	4,3	nd	18,7
32	4,1	nd	14,4
61	4,1	nd	16,8
23	4,0	nd	16,1
26	4,0	nd	13,6
49	4,0	nd	16,5
18	3,9	nd	16,4
8	3,8	nd	15,5
53	3,8	nd	20,2
63	3,8	nd	17,2
52	3,7	nd	17,3
17	3,6	nd	14,3

Evento nº	KS 352 FAME (% DCW)	Desvio Padrão	Ácido oleico (% FAME total)
36	3,6	nd	15,7
60	3,4	nd	16,6
12	3,3	nd	15,4
45	3,3	nd	15,2
62	3,3	nd	18,8
40	3,2	nd	13,3
25	3,0	nd	12,3
38	3,0	nd	16,2
57	2,5	nd	18,0
56	2,3	nd	18,2
58	2,2	nd	16,5

Evento nº	KS 349 FAME (% DCW)	Desvio Padrão	Ácido oleico (% FAME total)
28	10,8	1,0	33,2
16	10,6	3,1	32,7
25	10,3	0,9	34,1
19	9,7	0,2	31,5
8	9,5	0,9	34,7
7	9,4	0,3	34,3
18	9,3	0,1	34,3
30	9,2	0,0	32,3
3	8,6	0,6	32,9
20	8,5	0,1	32,9
24	8,4	0,1	30,8

Evento nº	KS 349 FAME (% DCW)	Desvio Padrão	Ácido oleico (% FAME total)
5	8,3	0,3	37,0
21	8,2	0,5	32,5
12	8,1	0,3	33,2
31	8,1	0,2	33,4
11	7,5	0,5	30,5
6	7,5	0,2	29,9
22	7,5	0,7	33,2
27	7,1	0,4	19,4
29	7,1	1,5	29,9
23	6,6	0,3	18,4
17	6,3	0,7	22,7
15	6,0	0,1	28,1
4	5,7	0,1	21,2
13	5,7	0,0	23,6
14	5,6	0,2	21,7
26	5,5	0,1	19,1
10	5,5	0,1	30,8
2	5,5	0,3	28,2
9	5,2	0,2	16,6
1	4,6	0,3	17,1

Evento nº	KS 362 FAME (% DCW)	Desvio Padrão	Ácido oleico (% FAME total)
28	14,7	0,3	28,9
16	14,5	0,1	33,1

Evento nº	KS 362 FAME (% DCW)	Desvio Padrão	Ácido oleico (% FAME total)
19	14,1	0,6	32,6
24	13,6	0,0	29,9
17	13,3	0,4	31,3
21	12,7	0,2	28,0
12	12,6	0,1	30,6
6	11,6	1,3	32,0
18	11,5	0,6	26,5
22	10,9	0,7	23,8
11	10,8	0,1	27,2
26	10,8	0,1	25,8
14	10,6	0,2	25,3
13	10,4	0,3	22,4
20	9,8	0,3	21,1
8	9,5	0,7	21,8
25	9,3	0,1	19,5
10	9,1	0,5	21,1
4	8,8	0,3	23,5
15	8,8	0,0	19,1
23	7,8	0,2	16,1
27	7,8	0,6	18,3
1	7,2	0,6	20,1
3	7,2	0,3	18,1
9	7,2	0,2	14,8
2	6,3	0,3	17,5
7	6,1	0,3	22,9

Evento nº	KS 362 FAME (% DCW)	Desvio Padrão	Ácido oleico (% FAME total)
5	4,6	0,2	17,3

Evento nº	KS 349/KS362 FAME (% DCW)	Desvio Padrão	Ácido oleico (% FAME total)
12	13,2	0,3	34,1
4	11,7	0,7	33,4
13	11,4	0,2	33,1
18	11,1	0,2	33,5
24	11,1	0,1	33,3
3	10,9	0,0	34,1
10	10,8	0,2	31,8
9	10,7	0,2	33,5
23	10,6	0,4	32,7
17	10,2	0,8	31,5
29	10,0	0,5	26,6
11	9,9	0,3	31,3
16	9,4	0,1	31,7
19	9,3	0,3	28,1
1	8,9	0,5	27,4
25	8,5	0,5	31,8
7	8,4	0,0	17,6
15	8,4	0,1	29,8
26	8,3	0,2	18,6
6	8,1	0,2	24,5

Evento nº	KS 349/KS362 FAME (% DCW)	Desvio Padrão	Ácido oleico (% FAME total)
5	7,4	0,1	19,3
21	7,4	0,8	18,0
27	6,9	0,8	25,7
30	6,9	0,7	24,7
2	6,0	0,3	18,2
14	5,6	0,4	23,0
22	5,6	0,2	17,6
8	4,6	0,1	17,4
28	4,2	0,2	19,7
20	2,8	0,1	11,9

Evento nº	KS 364 FAME (% DCW)	Desvio Padrão	Ácido oleico (% FAME total)
21	16,1	0,9	35,9
29	14,6	2,1	33,8
18	14,2	2,3	33,2
27	13,4	0,8	31,7
20	12,2	0,8	35,6
28	11,8	0,7	34,6
26	11,5	1,6	30,8
3	11,3	1,0	36,2
22	10,9	1,4	34,0
1	10,7	0,6	30,8
24	10,7	0,6	31,2

Evento nº	KS 364 FAME (% DCW)	Desvio Padrão	Ácido oleico (% FAME total)
25	10,6	0,2	31,2
6	10,2	0,4	32,6
2	10,1	0,3	31,0
5	9,9	0,5	33,3
11	9,8	0,4	37,8
12	9,8	0,6	37,0
8	9,4	0,1	31,5
10	9,3	0,1	31,2
15	9,2	0,4	33,7
16	9,1	0,2	33,9
19	8,7	0,1	27,3
7	8,4	0,6	26,7
4	7,6	0,1	28,1
23	5,7	0,2	21,1
9	4,2	0,3	15,1
14	4,2	0,2	15,1
17	3,6	0,4	21,9
13	3,5	0,1	15,0

[0297] Em resumo, os dados demonstram que, em embriões somáticos de soja, similares a sementes de *Arabidopsis*, a expressão genética de YL DGAT é associada ao aumento da incorporação de ácido oleico na fração de ácido graxo esterificado total. Ao contrário de *Arabidopsis*, entretanto, em embriões somáticos de soja, o aumento do teor de ácido oleico é firmemente correlacionado com o acúmulo total de ácido graxo esterificado. Em outras palavras, a expressão de YL DGAT2 isoladamente e a coexpressão de

YL DGAT1 e YL DGAT2 em embriões somáticos de soja gera aumento da biossíntese e incorporação de ácidos graxos na fração de ácido graxo esterificado total. Tomada em conjunto, esta descoberta sugere fortemente que a expressão de genes YL DGAT fornece uma estratégia eficiente para atingir um aumento no teor total de óleo de semente de soja.

EXEMPLO 6

EXPRESSÃO DE GENES DGAT DE *YARROWIA LIPOLYTICA* EM SEMENTE DE SOJA:

[0298] A construção de um plasmídeo controle (KS332) (Fig. 2) que contém apenas conjuntos de expressão de CaMV 35S PRO/HPT/NOSTER e Kti PRO/DsRed/Kti TER é descrita no Exemplo 5. A sua sequência é descrita como SEQ ID Nº 51.

[0299] Linhagens de soja transgênica foram geradas por meio do método de bombardeamento de disparador de partículas (Klein *et al.*, *Nature (London)* 327: 70-73 (1987); Patente US 4.945.050) utilizando um instrumento PDS1000/He Biolistic BIORAD e DNA de plasmídeo de KS332, KS362 e uma mistura 10:1 de KS349 e KS362 preparada conforme descrito no Exemplo 3. As soluções padrão a seguir e meios foram utilizados para transformação e regeneração de plantas de soja.

SOLUÇÕES PADRÃO:

[0300] Padrão 100 X Sulfato:

37,0 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,69 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,86 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0025 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

[0301] Padrão 100 X Haletos:

30,0 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,083 g de KI, 0,0025 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

[0302] Padrão 100 X P, B, Mo:

18,5 g de KH_2PO_4 , 0,62 g de H_3BO_3 , 0,025 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

[0303] Padrão 100 X Fe EDTA:

3,724 g de Na_2EDTA , 2,784 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

[0304] Padrão 2,4-D:

10 mg/ml de padrão 1000X Vitamina B5: 10,0 g de *bio*-inositol, 0,10 g de ácido nicotínico, 0,10 g de piridoxina HCl, 1 g de tiamina.

[0305] Meios (por litro):

SB196: 10 ml de cada uma das soluções padrão acima, 1 ml de padrão Vitamina B5, 0,463 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,83 g de KNO_3 , 1 ml de padrão 2,4-D, 1 g de asparagina, 10 g de sacarose, pH 5,7.

[0306] SB103:

1 pacote de mistura de sais Murashige & Skoog, 1 ml de padrão Vitamina B5, 750 mg de hexa-hidrato MgCl_2 , 60 g de maltose, 2 g de gelrita, pH 5,7.

[0307] SB166:

SB103 suplementado com 5 g por litro de carvão ativado.

[0308] SB71-4:

Sais B5 de Gamborg, 1 ml de padrão vitamina B5, 30 g de sacarose, 5 g de Agar TC, pH 5,7.

[0309] Para preparar tecido para transformação, cultivos de suspensão embriogênica de soja foram mantidos em 35 ml de meios líquidos (SB196) sobre um agitador giratório (150 rpm) a 28 °C com luzes fluorescentes que fornecem um ciclo de 16 horas de dia e 8 horas de noite. Cultivos foram subcultivados a cada duas semanas por meio de inoculação de cerca de 35 mg de tecido em 35 ml de meios líquidos novos.

[0310] Em procedimentos de bombardeamento de disparador de partículas, é possível utilizar, purificados, 1) DNA de plasmídeo inteiro; ou 2) fragmentos de DNA que contêm apenas o(s) conjunto(s) de expressão de DNA recombinante(s) de interesse. Para cada dezessete transformações de bombardeamento, são preparados 85 µl de suspensão que contêm de 1 a 90 picogramas (pg) de DNA de plasmídeo por par de bases de cada plasmídeo de

DNA. Os dois plasmídeos de DNA recombinantes foram coprecipitados sobre partículas de ouro conforme segue. Os DNAs em suspensão foram adicionados a 50 µl de uma suspensão de partículas de ouro de 0,6 µm a 20 a 60 mg/ml e combinados em seguida com 50 µl de CaCl_2 (2,5 M) e 20 µl de espermidina (0,1 M). A mistura foi turbilhonada por cinco segundos, centrifugada em um microcentrifugador por cinco segundos e o sobrenadante é removido. As partículas revestidas com DNA foram lavadas em seguida uma vez com 150 µl de etanol a 100%, turbilhonadas, centrifugadas novamente em um microcentrifugador e novamente suspensas em seguida em 85 µl de etanol anidro. Cinco microlitros das partículas de ouro revestidas com DNA foram carregadas em seguida sobre cada disco macroveículo.

[0311] Cerca de 150 a 250 mg de cultivo de suspensão com duas semanas de idade foram colocados em uma placa de petri de 60 mm x 15 mm vazia e o líquido residual removido do tecido utilizando uma pipeta. O tecido foi colocado a cerca de 8,9 cm de distância da tela de retenção e cada placa de tecido foi bombardeada uma vez. A pressão de ruptura de membrana foi definida a 650 psi e a câmara foi evacuada até -711 mm de Hg. Três placas foram bombardeadas e, após o bombardeamento, o tecido de cada placa foi dividido entre dois frascos, colocados de volta em meios líquidos e cultivado conforme descrito acima.

[0312] Sete dias após o bombardeamento, o meio líquido foi substituído por meio SB196 novo suplementado com 30 a 50 mg/l de higromicina. O meio seletivo foi renovado em seguida semanal ou bissemanalmente. Sete semanas após o bombardeamento, observou-se o crescimento de tecido transformado verde brilhante a partir de conjuntos embriogênicos cloróticos ou necróticos não transformados. Tecido verde isolado foi removido e inoculado em recipientes individuais em placas de cultivo com seis cavidades para gerar novos cultivos de suspensão embriogênica

transformados e propagados de forma clonal. Desta forma, cada nova linhagem foi tratada como evento de transformação independente em uma cavidade individual. Estas suspensões podem ser mantidas em seguida na forma de suspensões de embriões em conjunto em um estágio de desenvolvimento imaturo por meio de subcultivo ou podem ser regenerados em plantas inteiras por meio de maturação e germinação de embriões somáticos individuais.

[0313] Após duas semanas em cavidades celulares individuais, conjuntos embriogênicos transformados foram removidos do cultivo de líquidos e colocados sobre meio solidificado (SB166) que não contém hormônios nem antibióticos por uma semana. Os embriões foram cultivados a 26 °C com luzes fluorescentes e incandescentes misturadas em um cronograma de 16 h de dia e 8 h de noite. Após uma semana, os cultivos foram transferidos para meio SB103 e mantidos nas mesmas condições de crescimento por três semanas adicionais.

[0314] Embriões somáticos tornaram-se apropriados para germinação após quatro semanas, foram removidos em seguida do meio de maturação e secos em placas petri vazias por um a cinco dias. Os embriões secos foram plantados em seguida em meio SB71-4, onde foram mantidos em germinação sob as mesmas condições de luz e temperatura descritas acima. Embriões germinados foram transferidos para solo estéril e cultivados até a maturidade para a produção de sementes.

[0315] Um total de 29 linhagens transgênicas com sementes foi gerado com DNA de plasmídeo intacto de KS362 sob concentração de 15 pg por bp de DNA de plasmídeo por preparação de partículas de ouro (vide acima). Para cada evento, vinte sementes foram analisadas para determinar a presença do gene marcador de DS. Resumidamente, foram observadas sementes sob um microscópio estéreo (Leica MZ Fluo III) utilizando uma fonte de luz UV. Foi utilizado um conjunto de filtro customizado para fluorescência

associado à expressão de Vermelho DS com as propriedades a seguir: excitação $\lambda = 540-580$ nm / emissão $\lambda \geq 570$ nm. Em casos em que menos de vinte sementes eram disponíveis, todas as sementes foram avaliadas desta forma. Em seguida, o teor de óleo de soja foi medido por meio de NMR conforme descrito anteriormente 3. Dezenove eventos gerados com KS362 continham sementes que eram positivas para Vermelho DS. Destes, onze eventos exibiram uma diferença detectável no teor de óleo entre segregantes transgênicos positivos Vermelho DS e segregantes nulos negativos Vermelho DS. Os dados encontram-se resumidos na Tabela 9.

TABELA 9**TEOR DE ÓLEO DE SEMENTE DE SOJA T1 GERADA COM KS362**

	<i>n</i>	% média nulo de óleo	<i>n</i>	% média DsRed + de óleo	Pontos % delta	% delta
AFS4822.4.5.1	5	13,3	15	20,4	7,2	54,1
AFS4822.3.2.1	10	14,2	9	18,9	4,7	32,7
AFS4822.3.3.1	5	12,4	8	16,1	3,7	29,5
AFS4822.4.2.1	4	16,2	6	20,9	4,7	29,3
AFS4822.4.1.1	9	15,1	8	19,4	4,3	28,9
AFS4822.1.13.1	5	15,3	15	19,1	3,7	24,4
AFS4822.1.2.1	2	15,8	18	19,6	3,8	24,1
AFS4822.4.17.1	7	14,9	13	18,5	3,6	23,9
AFS4822.1.9.1	8	16,9	12	19,8	3,0	17,5
AFS4822.2.11.1	6	17,9	14	20,7	2,8	15,7
AFS4822.2.10.1	6	20,6	14	23,5	2,8	13,7

[0316] Foi gerado um total de dez linhagens transgênicas com DNA de KS332. Para cada evento, vinte sementes foram avaliadas para determinar a presença do gene marcador de DS conforme descrito acima.

[0317] Em casos em que menos de vinte sementes eram disponíveis, todas as sementes foram avaliadas desta forma.

[0318] Em seguida, o teor de óleo de sementes de soja foi medido por meio de NMR conforme descrito no Exemplo 4.

[0319] Sete eventos gerados com KS 332 continham sementes que foram positivas para Vermelho DS. Os dados encontram-se resumidos na Tabela 10.

TABELA 10

TEOR DE ÓLEO DE SEMENTES DE SOJA GERADAS COM KS332

	<i>n</i>	% média nulo de óleo	<i>n</i>	% média DsRed + de óleo	Pontos % delta	% delta
AFS4703.1.1.1	3	21,8	17	20,5	-1,4	-6,2
AFS4703.1.2.1	4	20,8	16	18,5	-2,3	-11,2
AFS4703.1.6.1	5	20,4	15	21,4	1,0	5,0
AFS4703.2.3.1	8	22,1	12	21,1	-0,9	-4,1
AFS4703.2.4.1	6	22,2	14	21,7	-0,4	-2,0
AFS4703.3.8.1	6	21,8	14	21,8	0,0	0,2
AFS4703.3.16.1	5	23,9	15	23,3	-0,6	-2,5

[0320] Ao contrário de sementes geradas com KS362, para sementes transgênicas geradas com KS332, nenhum aumento de óleo consistente pôde ser associado à presença do marcador Vermelho DS em

segregantes T1.

[0321] Quatro eventos gerados com KS362 foram submetidos a análise da situação de Vermelho DS e NMR de óleo de todas as sementes T1 disponíveis. Os dados encontram-se resumidos na Tabela 11.

TABELA 11

TEOR DE ÓLEO DE SEMENTES DE SOJA T1 GERADAS COM KS362

	<i>n</i>	% média nulo de óleo	<i>n</i>	% média DsRed + de óleo	Pontos % delta	% delta
AFS4822.4.5.1	8	12,0	24	18,3	6,3	52,9
AFS4822.1.13.1	17	15,0	42	18,7	3,7	24,6
AFS4822.1.2.1	4	15,7	40	19,3	3,5	22,3
AFS4822.2.10.1	8	19,5	25	23,0	3,5	17,8
AFS4822.2.11.1	6	17,9	17	20,3	2,4	13,5

[0322] Resumidamente, os dados das tabelas acima e da Figura 7 demonstram que a expressão específica de sementes de YL DAGT2 gera aumento da biossíntese de óleo durante a maturação de sementes de soja e, desta forma, fornece uma ferramenta de engenharia metabólica eficiente para aumentar o acúmulo de óleo em grãos de soja.

[0323] Gerou-se um total de dezesseis linhagens transgênicas com sementes por meio de cobombardeamento com DNA de KS349 e KS362 que havia sido misturado em uma razão 10:1 (vide o Exemplo 4). A mistura de DNA foi fornecida em transformação de soja em concentração final de 15 pg por bp de DNA de plasmídeo por preparação de partículas de ouro. Resumidamente, antes do bombardeamento, DNA KS349 foi digerido com PstI,

XhoI para desativação do gene marcador selecionável sobre esse plasmídeo. DNA de KS362 foi linearizado com Sall. É razoável considerar que, devido ao tratamento prévio do DNA, o gene marcador selecionável em todas as transformações foi fornecido a partir do plasmídeo (KS362) que foi bombardeado na concentração de DNA mais baixa. Inspeção inicial dessas sementes sob o estereomicroscópio de fluorescência revelou que muito poucos eventos desta transformação continham semente T1 que era positiva para o gene marcador Vermelho DS. Este resultado pode ser devido à proximidade entre o conjunto de expressão de Vermelho DS e o final do fragmento de restrição de Sall de KS362 que foi utilizado para transformação de soja. Pode haver resultado na integração de fragmentos de DNA de KS362 que não continham um conjunto de expressão de Vermelho DS funcional. Por esta razão, sementes T1 foram selecionados pela ausência ou presença do YL DGAT derivado de transgenes testando-se a composição de ácidos graxos de sementes. Para cada evento, vinte sementes foram analisadas por meio de GC. Cinquenta sementes de soja não transformada foram processadas da mesma forma. Flocos de sementes de soja foram produzidos cortando-se a semente com uma lâmina de barbear, evitando-se o eixo embriônico. Flocos de sementes com cerca de 2 mg foram colocados em uma ampola contendo 50 µl de hidróxido de trimetilsulfônio e 0,5 ml de hexano. Os flocos foram incubados por trinta minutos à temperatura ambiente mediante agitação. Cinco microlitros da camada de hexano foram injetados em um Cromatógrafo de Gás Hewlett Packard 6890 contendo uma coluna capilar de sílica fundida Omegawax 320 (Supelco Cat. nº 24152). As condições do forno foram as seguintes: temperatura inicial de 220 °C por 2,7 minutos, elevada para 240 °C ao longo de um minuto e mantida a 240 °C por um tempo total de condução de seis minutos. Os tempos de retenção foram comparados com padrões disponíveis comercialmente (Nu-Chek Prep, Inc., cat. nº U-99-A). Os ácidos graxos foram

determinados por meio de transesterificação direta de padrões individuais em 0,5 ml de H₂SO₄ metanólico (2,5%). Metil ésteres de ácidos graxos foram extraídos das soluções metanólicas em hexano após a adição de um volume igual de água.

[0324] Foram identificados dez eventos que continham sementes T1 com teor de ácido oleico $\geq 25\%$. Como este teor de ácido oleico não foi observado em sementes de soja não transformadas (vide a Fig. 6 e a Tabela 12) e o aumento do teor de ácido oleico foi associado anteriormente à coexpressão de YL DGAT2 e YL DGAT1 e YL DGAT2 em sementes de Arabidopsis e embriões somáticos de soja, acredita-se que a presença de ácido oleico em níveis de $\geq 25\%$ forneça meios eficientes de identificação de sementes T1 positivas para YL DGAT. Após análise de GC para genotipificação de YL DGAT, as sementes foram submetidas a medições de óleo por meio de NMR conforme descrito anteriormente (Exemplo 3). Quando o teor de ácido oleico foi plotado contra o teor total de óleo, sete dos dez eventos com semente T1 de $\geq 25\%$ demonstraram uma correlação de $R^2 \geq 0,3$ entre óleo e teor de ácido oleico. As propriedades destes eventos são descritas com mais detalhes na Tabela 12.

TABELA 12

TEOR DE ÓLEO DE SEMENTES DE SOJA GERADAS COM KS349/KS362

	<i>n</i>	% média óleo <25% oleico	<i>n</i>	% média óleo $\geq 25\%$ oleico	Pontos % delta	% delta	R ² % oleico/% óleo
AFS4818.3.1.1	15	11,9	5	16,8	4,9	41,0	0,38
AFS4818.1.5.1	10	15,5	10	20,0	4,5	28,7	0,69

	<i>n</i>	% média óleo <25% oleico	<i>n</i>	% média óleo ≥25% oleico	Pontos % delta	% delta	R ² % oleico/% óleo
AFS4818.2.10.1	10	13,2	10	16,5	3,3	25,2	0,39
AFS4818.1.9.1	5	12,9	14	15,9	3,0	22,9	0,51
AFS4818.2.6.1	12	18,6	8	21,9	3,4	18,1	0,51
AFS4818.1.3.1	6	20,5	14	23,6	3,1	14,9	0,45
AFS4818.1.2.1	6	19,4	14	21,8	2,4	12,4	0,37
Jack (controle em peso)	56	21,7					0,003

[0325] Sementes Jack do tipo selvagem foram cultivadas sob condições similares às utilizadas para a geração de sementes T1 e analisadas por meio de análise NMR e GC. Observou-se que o teor de ácido oleico e óleo flutuou de 7,6 a 20,5% e 18,6 a 25,2%, respectivamente. Nenhuma correlação entre o teor de ácido oleico e o teor de óleo pôde ser observada em sementes de soja não transformadas.

[0326] Quatro eventos gerados com KS349/KS362 foram submetidos à análise de GC e NMR de todas as sementes T1 disponíveis. Os dados encontram-se resumidos na Tabela 13.

TABELA 13**TEOR DE ÓLEO DE SEMENTES DE SOJA T1 GERADAS COM KS349/KS362**

	<i>n</i>	% média óleo <25% oleico	<i>n</i>	% média óleo ≥25% oleico	Pontos % delta	% delta	R ² % oleico/% óleo
AFS4818.1.5.1	21	16,3	21	20,2	3,9	23,8	0,55
AFS4818.2.6.1	49	18,1	23	21,9	3,7	20,7	0,50
AFS4818.1.3.1	33	20,2	67	23,5	3,3	16,2	0,43
AFS4818.1.2.1	13	19,3	26	22,1	2,7	14,1	0,45

[0327] Tomados em conjunto, os dados das tabelas anteriores e das Figuras 6 e 7 sustentam fortemente a conclusão de que a coexpressão de genes YL DGAT1 e YL DGAT2, como a expressão do gene YL DGAT2 isoladamente, fornece uma estratégia eficiente para atingir aumento do teor total de óleo de sementes de soja. Além disso, dever-se-á observar que um alto número de eventos poderá ser identificado com uma diferença de óleo de ≥2% pontos entre segregantes nulos e transgênicos dentre um pequeno conjunto de eventos transgênicos selecionados.

EXEMPLO 7**EXPRESSÃO DE GENES DGAT DE *YARROWIA LIPOLYTICA* EM MILHO:**

[0328] Com base nos resultados descritos nos Exemplos 4, 5 e 6 do presente pedido, os genes YL DGAT1 e YL DGAT2 podem ser expressos no embrião de sementes de milho para aumentar o teor de óleo desse tecido. Conforme descrito abaixo, este resultado pode ser atingido transformando-se milho com conjuntos de expressão que compreendem quadros de leitura aberta de DGAT1 e DGAT2 de *Yarrowia lipolytica* ligados operacionalmente sobre as

suas extremidades 5' de promotores preferidos de embriões, tais como o promotor do gene oleosina de 16 kDa de milho (Lee, K. e Huang, A. H., *Plant Mol. Biol.* 26: 1981-1987 (1984)) e promotor abundante de embrião de milho (EAP1) e terminal (US 2006272058 A1).

[0329] Um conjunto de expressão que compreende o promotor do gene oleosina de 16 kDa de milho (OLE PRO), a sequência de codificação do gene YL DGAT2 (SEQ ID Nº 9) e a sequência de sinal de poliadenilação/terminal do gene nopalino sintase (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens* é construída utilizando métodos e tecnologias conhecidos no estado da técnica. Um segundo conjunto de expressão compreende o gene YL DGAT1 sob o controle de transcrição do terminal e promotor de proteína abundante (EAP1) de milho, com o ADH1 INTRON1 de milho inserido entre a sequência promotora e de codificação para maior expressão. Os dois conjuntos de expressão são ligados, junto com um gene que codifica um marcador selecionável, em um vetor binário apropriado para transformação de milho mediada por *Agrobacterium*.

[0330] Um protocolo com base em *Agrobacterium* pode ser utilizado para a transformação de milho (vide abaixo). O vetor binário resultante é introduzido em células LBA4404 de *Agrobacterium* (PHP10523), preferencialmente por meio de eletroporação. Uma recombinação *in vivo* gera um plasmídeo cointegrado entre o vetor binário introduzido e o plasmídeo *vir* (PHP10523) residente nas células de *Agrobacterium*. As células de *Agrobacterium* resultantes são utilizadas para transformar milho.

TRANSFORMAÇÃO DE MILHO MEDIADA POR AGROBACTERIUM:

[0331] Embriões imaturos recém-isolados de milho, cerca de dez dias após a polinização (DAP), podem ser incubados com o *Agrobacterium*. O genótipo preferido para transformação é o genótipo altamente transformável Hi-II (Armstrong, *Maize Gen. Coop. Newsletter* 65: 92-93 (1991)). Um híbrido F1

criado pelo cruzamento de um Hi-II com uma linhagem congênita de elite pode também ser utilizado. Após o tratamento de embriões imaturos com *Agrobacterium*, os embriões podem ser cultivados sobre meio que contém níveis tóxicos de herbicida. Apenas as células que recebem o gene de resistência a herbicidas e o(s) gene(s) ligado(s) crescem sobre meio seletivo. Eventos transgênicos selecionados desta forma podem ser propagados e regenerados em plantas inteiras, produzir sementes e transmitir transgenes para a prole.

PREPARAÇÃO DE AGROBACTERIUM:

[0332] O LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* elaborado pode ser construído para conter plasmídeos para expressão preferida por sementes de genes YL DGAT1 e YL DGAT2, conforme descrito na Patente US 5.591.616 (cujo conteúdo é incorporado ao presente como referência). Para utilizar a construção elaborada em transformação de plantas, uma placa mestre de uma colônia bacteriana isolada transformada com plasmídeos para expressão preferida por sementes de genes YL DGAT1 e YL DGAT2 pode ser preparada por meio de inoculação das bactérias sobre meio AB mínimo e permitindo-se a incubação a 28 °C por cerca de três dias (a composição e a preparação de meio AB mínimo foram descritas anteriormente no documento WO 02/009040 (cujo conteúdo é incorporado ao presente como referência). Uma placa de trabalho pode ser preparada em seguida riscando-se o *Agrobacterium* transformado sobre meio YP (0,5% (p/v) extrato de levedura, 1% (p/v) peptona, 0,5% (p/v) cloreto de sódio, 1,5% (p/v) Agar) que contém 50 µg/ml de espectinomicina.

[0333] O *Agrobacterium* transformado para transfecção e cocultivo de plantas pode ser preparado em seguida um dia antes da transformação de milho. Em 30 ml de meio A mínimo (preparado conforme descrito no documento WO 02/009040) em um frasco, foram colocados 50 µg/ml de

espectinomicina, 100 µM de acetossiringona e cerca de 1/8 circuito cheio de *Agrobacterium* de uma placa de trabalho com dois dias de idade. O *Agrobacterium* pode ser cultivado em seguida a 28 °C com agitação a 200 rpm por cerca de quatorze horas. Em fase de registro intermediário, o *Agrobacterium* pode ser colhido e novamente suspenso em uma densidade de 3 a 5 x 10⁸ CFU/ml em meio 561Q que contém 100 µM de acetossiringona utilizando métodos microbianos padrão. A composição e a preparação de meio 561Q foram descritas no documento WO 02/009040.

PREPARAÇÃO DE EMBRIÕES IMATUROS:

[0334] Nove a dez dias após a polinização controlada de uma planta de milho, embriões imaturos em desenvolvimento são opacos e possuem 1 a 1,5 mm de comprimento. Este comprimento é o tamanho ideal de infecção com o *Agrobacterium* transformado por PHP18749. As espigas debulhadas podem ser esterilizadas em alvejante comercial a 50% e uma gota de Tween 20 por trinta minutos e enxaguadas duas vezes em seguida com água estéril. Os embriões imaturos podem ser removidos assepticamente em seguida da cariopse e colocados em 2 ml de solução de manutenção estéril que consiste em meio 561Q que contém 100 µM de acetossiringona.

INFECCÃO COM *AGROBACTERIUM* E COCULTIVO DE EMBRIÕES:

[0335] A solução de manutenção pode ser decantada a partir dos embriões imaturos extirpados e substituída com *Agrobacterium* transformado. Após mistura suave e incubação por cerca de cinco minutos, o *Agrobacterium* pode ser decantado a partir dos embriões imaturos. Os embriões imaturos foram movidos em seguida para uma placa de meio 562P, cuja composição foi descrita anteriormente no documento WO 02/009040. Os embriões imaturos podem ser colocados sobre essa superfície de escutelo de meios apontada para cima e incubados em seguida a 20 °C por três dias no escuro. Esta etapa pode ser seguida por incubação a 28 °C por três dias no escuro sobre meio

562P que contém 100 µg/ml de carbenecilina conforme descrito na Patente US 5.981.840.

SELEÇÃO DE EVENTOS TRANSGÊNICOS:

[0336] Após a incubação, os embriões imaturos podem ser transferidos para meio 5630, que pode ser preparado conforme descrito no documento WO 02/009040. Este meio contém Bialafós para seleção de células de plantas transgênicas conforme conferido pelo gene BAR que é ligado ao conjunto de expressão de HGGT de cevada. Em intervalos de dez a quatorze dias, os embriões foram transferidos para meio 5630. Tecido embriogênico transgênico suposto em crescimento ativo pode ser após seis a oito semanas de incubação sobre o meio 5630.

REGENERAÇÃO DE PLANTAS T₀:

[0337] Tecido embriogênico transgênico é transferido para meio 288W e incubado a 28 °C no escuro até o amadurecimento de embriões somáticos ou cerca de dez a dezoito dias.

[0338] Embriões somáticos amadurecidos individuais com escutelo e coleóptilo bem definidos são transferidos para meio de germinação de embriões 272 e incubados a 28 °C na luz. Após a emergência de raízes e brotos, plantas individuais são colocadas em vasos no solo e endurecidas utilizando métodos hortícolas típicos.

[0339] Meio 288W contém os ingredientes a seguir: 950 ml de água deionizada; 4,3 g de sais MS (Gibco); 0,1 g de mioinositol; 5 ml de solução padrão de vitaminas MS (Gibco); 1 ml de zeatina (solução de 5 mg/ml); 60 g de sacarose; 8 g de ágar (Sigma A-7049, purificado), 2 ml de ácido indoloacético (solução de 0,5 mg/ml*); 1 ml de 0,1 mM de ABA*; 3 ml de Bialafós (solução de 1 mg/ml*); e 2 ml de carbenicilina (solução de 50 mg/ml). O pH desta solução é ajustado em pH 5,6. A solução é colocada em autoclave e os ingredientes marcados com um asterisco (*) são adicionados após o

resfriamento de meios a 60 °C.

[0340] O meio 272 contém os ingredientes a seguir: 950 ml de água deionizada; 4,3 g de sais de MS (Gibco); 0,1 g de mioinositol; 5 ml de solução padrão de vitaminas MS (Gibco); 40 g de sacarose; e 1,5 g de gelrita. Esta solução é ajustada em pH 5,6 e colocada em autoclave em seguida.

EXEMPLO 8

ANÁLISE DO TEOR DE ÓLEO DE SEMENTE:

[0341] Análise de ressonância magnética nuclear (NMR):

As sementes são embebidas em água destilada por doze a 24 horas a 4 °C;

O embrião é dissecado e armazenado em uma placa de 48 cavidades. As amostras são liofilizadas por uma noite em um liofilizador Virtis 24x48. O NMR (Process Control Technologies – PCT (Ft. Collins CO) é configurado conforme as instruções do fabricante. O NMR é calibrado utilizando uma série de tubos NMR de 5 mm que contêm quantidades precisamente medidas de óleo de milho (Mazola). Os padrões de calibragem são 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 27, 33 e 40 mg de óleo.

EXEMPLO 9

SÍNTESE DE GENES YL DGAT1 E YL DGAT2:

[0342] Sequências de nucleotídeos que codificam YL DGAT1 e YL DGAT2 foram projetadas para expressão otimizada em sementes de soja utilizando métodos similares aos descritos em Wu, G. *et al.*, *Nucleic Acids Research* (2007), 35: D76-D79; Villalobos, A. *et al.*, *BMC Bioinformatics* (2006), 7, páginas não fornecidas; Wu, G. *et al.*, *Protein Expression and Purification* (2006), 47: 441-445; Richardson, S. M. *et al.*, *Genome Research* (2006), 16: 550-556; Jayaraj, S. *et al.*, *Nucleic Acids Research* (2005) 33: 3011-3016. As moléculas de DNA foram sintetizadas por meio de DNA 2.0 (Menlo Park CA, Estados Unidos). Sequências de DNA otimizadas por expressão de YL DGAT1

e YL DGAT2 são descritas em SEQ ID Nº 64 e SEQ ID Nº 66, respectivamente. As sequências de aminoácidos de enzimas otimizadas com soja são descritas em SEQ ID Nº 65 (YL DGAT1) e SEQ ID Nº 67 (YL DGAT2) e são idênticas aos produtos de tradução de SEQ ID Nº 1 e SEQ ID Nº 9, respectivamente.

EXEMPLO 10

COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA QUE EXPRESSAM GENES YL DGAT:

[0343] Embriões somáticos transgênicos foram gerados utilizando as construções de plasmídeos KS352, KS349, KS362 e KS364. A geração das construções de DNA e o processo de transformação são descritos em detalhes no Exemplo 5. A composição de ácidos graxos foi determinada por meio de análise GC de metil ésteres de ácidos graxos gerados por meio de derivação de metóxido de sódio de extratos de heptano. As descobertas encontram-se resumidas na Tabela 14. A tabela compara a composição de ácidos graxos de cem eventos gerados com um plasmídeo controle que não contém genes YL DGAT com o de eventos criados com plasmídeos que contêm YL DGAT1 (KS349), YL DGAT2 (KS362) ou os dois genes (KS364). Para eventos gerados com YL DGAT que contêm construções de DNA, é exibida a composição média de ácidos graxos de todos os eventos com mais de 30% de oleico.

TABELA 14

COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA GERADOS COM KS 352, 349, 362, 349+362 E 364

Plasmídeo	<i>n</i>	Ácido palmítico	Ácido esteárico	Ácido oleico	Ácido linoleico	Ácido linolênico
Média de KS352	100	15,9	5,2	17,9	44,1	16,9
Faixa de KS352		12,6-20,8	4,2-6,6	12,3-22,9	39,3-46,9	12,4-23,5

Plasmídeo	<i>n</i>	Ácido palmítico	Ácido esteárico	Ácido oleico	Ácido linoleico	Ácido linolênico
Média de KS349 (>30% oleico)	18	11,6	5,4	33,0	41,3	8,6
Faixa de KS349 (>30% oleico)		10,7-12,8	4,2-6,5	30,5-37,0	38,7-44,6	7,8-10,7
Média de KS362 (>30% oleico)	5	11,5	6,3	31,9	43,2	6,9
Faixa de KS362 (>30% oleico)		10,9-12,7	5,7-7,0	30,6-33,1	41,9-44,8	6,2-7,7
Média de KS349+362 (>30% oleico)	14	12,8	5,4	33,8	39,7	8,4
Faixa de KS349+362 (>30% oleico)		11,5-14,4	3,8-7,0	30,8-35,5	38-42,7	6,3-10,3
Média de	14	10,9	6,4	39,0	38	5,7

Plasmídeo	<i>n</i>	Ácido palmítico	Ácido esteárico	Ácido oleico	Ácido linoleico	Ácido linolênico
KS364 (>30% oleico)						
Faixa de KS364 (>30% oleico)		9,2-12,6	5,9-7,7	32,8-48,6	31,4-42,7	3,2-6,5

[0344] A tabela demonstra que a expressão de YL DGAT1 ou YL DGAT2, bem como a coexpressão desses genes, altera o perfil de FA de embriões somáticos de soja.

[0345] A alteração mais pronunciada é um aumento de ácido oleico e redução de ácido linolênico que são consistentemente observados com todas as construções de DNA testadas. A expressão de genes YL DGAT também gera uma redução de ácido palmítico e linoleico e um aumento de ácido esteárico.

EXEMPLO 11

COMPOSIÇÃO DE ÁCIDO GRAXO DE GENES YL DGAT QUE EXPRESSAM SEMENTES

DE SOJA:

[0346] O evento AFS4822.1.13.1 foi gerado utilizando DNA de plasmídeo de KS362 conforme descrito no Exemplo 6. Sementes T1 transgênicas exibem um aumento do teor de óleo de 24,6% quando comparado com sementes segregantes nulas da mesma planta T1. Esta observação sustenta fortemente a conclusão de que estes eventos expressam YL DGAT2. Semente T1 de AFS4822.1.13.1 com ou sem o transgene YL DGAT2 germinou e cresceu na câmara de crescimento por três meses. Sementes T1 Vermelho DS positivas do evento AFS4703.1.6 germinaram e cresceram ao lado do

evento YL DGAT2. AFS4703.1.6 foi gerado com KS332, um vetor de plasmídeo que contém o gene marcador Vermelho DS, mas não contém YL DGAT2 (vide o Exemplo 5). Puderam ser identificados diversos segregantes de T1 que produziram apenas sementes T2 Vermelho DS positivas, o que indica que essas linhagens foram homozigóticas para o transgene correspondente. Sementes T2 colhidas de prole segregante nula foram negativas para Vermelho DS, o que confirma que essas linhagens provavelmente não continham um transgene funcional.

[0347] Para cada seleção, seis sementes foram picadas e a composição de ácido graxo dos flocos de sementes foram analisadas por meio de derivação de TMSH seguida por cromatografia de gás conforme descrito no Exemplo 6. A Tabela 15A compara a composição média de ácidos graxos de seis flocos de sementes de segregantes Vermelho DS positivos de AFS4822.1.13.1 com a de flocos de sementes derivadas de uma planta segregante nula e de flocos de sementes do evento AFS4703.1.6 que contém apenas o gene marcador Vermelho DS. Ela demonstra que a expressão de YL DGAT2 altera o perfil de FA de sementes de soja. A alteração mais pronunciada é um aumento de ácido oleico e uma redução de ácido linolênico. A expressão de genes YL DGAT também gera uma redução de ácido palmítico e linoleico e um aumento de ácido esteárico.

TABELA 15A

COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE SEMENTES DE SOJA T2 GERADAS COM KS362

Evento	<i>n</i>	ácido palmítico	ácido esteárico	ácido oleico	ácido linoleico	ácido linolênico
Média de AFS4822.1.13.1 (Vermelho DS positivo)	6	10,8	4,6	29,2	49,5	6,0

Evento	<i>n</i>	ácido palmítico	ácido esteárico	ácido oleico	ácido linoleico	ácido linolênico
Média de AFS4822.1.13.1 (segregante nulo)	6	12,0	3,4	16,3	59,0	9,4
Média de AFS4703.1.6 (Vermelho DS positivo)	6	11,5	3,3	15,8	59,8	9,6

TABELA 15B

**COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE SEMENTES DE SOJA T2 GERADAS POR MEIO
DE COTRANSFORMAÇÃO COM KS349 E KS362**

Evento	<i>n</i>	Ácido palmítico	Ácido esteárico	Ácido oleico	Ácido linoleico	Ácido linolênico
Média de AFS4818.1.9	58	10,8	4,5	27,9	49,6	7,2
Média de AFS4818.1.9 (segregante nulo)	42	12,2	3,4	14,3	57,0	13,0
Média de AFS4818.1.3	34	10	4,2	31,6	48,7	5,5
Média de AFS4818.1.3 (segregante nulo)	14	11,4	3,0	16,4	58,7	10,5

[0348] Os eventos AFS4818.1.9 e AFS4818.1.3 foram gerados utilizando uma mistura de fragmentos de DNA derivados de plasmídeos KS349 (YL DGAT1) e KS362 (YL DGAT2) conforme descrito no Exemplo 5. A semente T1 transgênica destes dois eventos exibe um aumento do teor de óleo de 22,9 e 16,2%, respectivamente, quando comparado com semente segregante nula da mesma planta T1.

[0349] Embora esta observação sustente fortemente a conclusão de que os dois eventos expressam YL DGAT derivado de transgene, não é claro se estes dois eventos contêm cópias intactas de ambos ou apenas de um gene DGAT presente na mistura de DNA utilizada para transformação. Sementes T1 com aumento do teor de óleo e ácido oleico (vide Exemplo 6) foram plantadas para os eventos AFS4818.1.2, AFS4818.1.3, AFS4818.1.5, AFS4818.2.6 e AFS4818.1.9. O DNA foi isolado, digerido com as duas enzimas de restrição EcoRI e HindIII e transferidas para membranas de nylon utilizando protocolos padrão. Manchas duplicadas foram produzidas e hibridizadas independentemente com sondas correspondentes a um fragmento de restrição de 1,21 kb do gene YL DGAT1 (gerado por meio de digestão de KS349 com NcoI/EcoRI) e os genes YL DGAT2 intactos (gerados por meio de digestão de NotI de KS 362). Com base na sequência de KS 349 (SEQ ID Nº 48) e KS 362 (SEQ ID Nº 52), a inserção de uma cópia intacta de gene YL DGAT1 e YL DGAT2 no genoma de soja seria indicada por um forte sinal de hibridização de fragmentos de restrição com um tamanho de $\geq 1,908$ e $\geq 3,335$ kb, respectivamente. Ao atender isso, todos os eventos exibiram faixas fortemente hibridizantes de $\geq 1,908$ kb ao utilizar-se uma sonda de YL DGAT1 (Figura 8A). Nenhum sinal de hibridização foi observado ao utilizar-se DNA de grãos de soja não modificados (linhas 11 e 12, Figura 8A e B).

[0350] Isso demonstra que todos os eventos testados possuem inserções de pelo menos uma cópia do conjunto de expressão de YL DGAT1

intacto presente sobre KS 349.

[0351] Ao utilizar-se DNA de YL DGAT2 em experimentos de hibridização, entretanto, o evento 4818.1.9 não apenas exibiu uma faixa muito fracamente hibridizante com alto MW, mas também todos os outros eventos testados exibiram faixas fortemente hibridizantes de $\geq 3,335$ kb (linha 9, Figura 8B).

[0352] O próximo DNA genômico de todos os cinco eventos foi digerido com BstXI, transferido para membranas de nylon e sondado com DNA de YL DGAT2 intacto gerado conforme descrito acima (Figura 9).

[0353] A inserção de uma cópia intacta do conjunto de expressão de YL DGAT2 seria indicada por faixas fortemente hibridizantes de 0,584 kb (fragmento interno) e fragmentos adicionais de $\geq 0,2$ e $\geq 0,77$ kb.

[0354] Todos os eventos, exceto 4818.1.9, exibem o padrão de hibridização indicativo da inserção completa de YL DGAT2. Concluiu-se que 4818.1.9 contém apenas uma unidade de expressão funcional para YL DGAT1.

[0355] Plantas T1 de eventos 4818.1.9 e 4818.1.3 que foram derivadas de semente com teor elevado de óleo e oleico de evento 4818.1.9 e 4818.1.3 foram cultivadas até a maturidade e as sementes foram colhidas.

[0356] A composição de ácido graxo de sementes T2 foi determinada por meio de derivação de TMSH e análise de GC de flocos de sementes derivados de sementes T2.

[0357] A tabela compara a composição de ácidos graxos de sementes segregantes nulas e transgênicas de uma planta T2 de 4818.1.9 e 4818.1.3 (Tabela 15B). Ela demonstra que a expressão de YL DGAT1, bem como a coexpressão de YL DGAT1 e YL DGAT2, altera o perfil de FA de sementes de soja.

[0358] A alteração mais pronunciada é um aumento do teor de

ácido oleico e redução de ácido linolênico.

[0359] A expressão de genes YL DGAT também gera uma redução de ácido palmítico e linoleico e um aumento de ácido esteárico.

EXEMPLO 12

ANÁLISE DE EVENTOS TRANSGÊNICOS – CÂMARA DE CRESCIMENTO:

[0360] O presente exemplo descreve medições do teor de óleo de soja derivada de plantas T2 que foram homozigóticas ou heterozigóticas para transgenes que compreendem genes YL DGAT1 ou YL DGAT2 ou ambos YL DGAT. As plantas T2 foram cultivadas em um ambiente controlado (câmara de crescimento).

[0361] Análise de óleo de sementes de soja T2 derivadas de plantas cultivadas em uma câmara de crescimento de plantas foi realizada por meio de NMR. As sementes foram colhidas de plantas individuais.

[0362] Seleções de sementes de plantas heterozigóticas derivadas de transformações com o gene DGAT2 de *Yarrowia* exibiram segregação do marcador Vermelho DS. O teor de óleo de sementes Vermelho DS positivas (com transgene DGAT2) e sementes segregantes nulas da mesma planta é exibido na Tabela 16.

[0363] Na mencionada tabela, o teor de óleo de sementes que contêm o transgene DGAT2 é comparado com o de sementes segregantes nulas não transgênicas da mesma planta.

TABELA 16

TEOR DE ÓLEO DE SEMENTES TRANSGÊNICAS E SEMENTES SEGREGANTES NULAS
DERIVADAS DE PLANTAS T2 DE SOJA TRANSGÊNICA QUE SEGREGAM TRANSGENE
COM O GENE DGAT2 DE *YARROWIA*

Evento	Planta	Óleo médio transg. (%)	<i>n</i>	Óleo médio nulo (%)	<i>n</i>	Pontos % Δ	% Δ
4822.1.13	A	22,2	37	19,6	11	2,3	11,5
	B	21,4	27	19,5	13		
	média	21,8		19,6			
4822.4.5	A	22,3	35	18,4	13	3,6	19,6
	B	22,5	38	18,5	10		
	C	21,7	31	17,7	17		
	D	22,7	31	18,2	17		
	E	21,7	23	18,9	17		
	média	22,2		18,6			
4822.1.9	A	22,9	33	20,4	7	2,5	12,3
4822.2.10	A	24,3	62	20,1	24	3,3	16,3
	B	23	30	19,5	10		
	C	22,5	23	20,5	17		
	média	23,3		20,0			

[0364] Seleções de sementes T2 de eventos gerados por meio de cotransformação de KS349 e KS362 foram realizadas por meio de análise de GC de flocos de sementes conforme descrito acima (Exemplo 6). Sementes foram colhidas de plantas individuais. Seleções de sementes de plantas heterozigóticas derivadas de transformações com genes DGAT de *Yarrowia*

segregados pelo elevado teor de ácido oleico (>22% de FA total). O Exemplo 11 descreve que o evento 4818.1.9 contém apenas um conjunto de expressão intacto para o gene DGAT1 de *Yarrowia*. O teor de óleo das sementes com elevado teor de ácido oleico (com transgene DGAT1) e semente segregante nula da mesma planta é exibida na Tabela 17. Nesta tabela, o teor de óleo de sementes que contém o transgene DGAT1 foi comparado com o de plantas segregantes nulas não transgênicas da mesma planta.

TABELA 17

TEOR DE ÓLEO DE SEMENTES TRANSGÊNICAS E SEMENTES SEGREGANTES NULAS
DERIVADAS DE PLANTAS T1 DE SOJA TRANSGÊNICA QUE SEGREGAM TRANSGENE
COM O GENE DGAT1 DE YARROWIA

Evento	Planta	Óleo médio transg. (%)	<i>n</i>	Óleo médio nulo (%)	<i>n</i>	Pontos % Δ	% Δ
4818.1.9	A	21,8	58	18,9	42	4,4	25,1
	B	21,3	16	17,0	6		
	C	23,1	34	17,0	14		
	média	22,1		17,6			

[0365] O Exemplo 11 descreve que outros eventos gerados por meio de cotransformação de KS349 e KS362 contém um conjunto de expressão intacto para os dois genes DGAT de *Yarrowia*. O teor de óleo de sementes com elevado teor de ácido oleico (com os dois transgenes DGAT) e sementes segregantes nulas da mesma planta é exibido na Tabela 18. Nesta tabela, o teor de óleo de sementes que contém os dois transgenes DGAT foi comparado com o de plantas segregantes nulas não transgênicas da mesma planta.

TABELA 18**TEOR DE ÓLEO DE SEMENTES TRANSGÊNICAS E SEMENTES SEGREGANTES****NULAS DERIVADAS DE PLANTAS T1 DE SOJA TRANSGÊNICA QUE SEGREGAM****TRANSGENES COM OS GENES DGAT1 E DGAT2 DE *YARROWIA***

Evento	Planta	Óleo médio transg. (%)	<i>n</i>	Óleo médio nulo (%)	<i>n</i>	Pontos % Δ	% Δ
4818.1.2	A	23,9	33	20	15	3,4	17,3
	B	22,9	35	20,3	13		
	C	23	31	19,2	17		
	média	23,3		19,8			
4818.1.3	A	24,5	32	21,6	16	3,4	16,3
	B	23,6	34	19,5	14		
	C	25,3	28	22	20		
	média	24,5		21,0			
4818.2.6	A	22,3	31	19	17	3,2	15,8
	B	24,1	21	20,6	27		
	C	24,1	23	20,7	25		
	D	23,2	30	20,6	18		
	média	23,4		20,2			

[0366] Seleção de sementes T2 homozigóticas para o conjunto de expressão de DGAT2 de *Yarrowia* derivado de KS362 não segregou mais o marcador Vermelho DS. O teor de óleo de 48 sementes (ou todas as sementes disponíveis caso fossem disponíveis menos de 48 sementes) foi medido por meio de NMR. Para cada evento, sementes T1 Vermelho DS negativas foram plantadas e sementes T2 de segregantes nulos foram colhidas de plantas

cultivadas na mesma câmara de crescimento utilizada para o cultivo de plantas T1 homozigóticas para o transgene DGAT. O teor de óleo de sementes derivadas de seleções segregantes nulas e linhagens homozigóticas para o transgene DGAT é exibido na Tabela 19.

TABELA 19

TEOR DE ÓLEO DE SEMENTES SEGREGANTES NULAS E SEMENTES TRANSGÊNICAS

DERIVADAS DE PLANTAS T1 DE SOJA TRANSGÊNICA QUE SÃO HOMOZIGÓTICAS PARA

TRANSGENES COM O GENE DGAT2 DE YARROWIA

Evento	Planta	<i>n</i>	Óleo médio (%)	Pontos % Δ	% Δ
4822.1.13	A	48	22,7	2,3	11,6
	B	48	21,9		
	C	48	22,7		
	média		22,4		
	nulo A	48	19,7		
	nulo B	48	20,5		
	média		20,1		
4822.1.9	A	48	23,0	3,6	18,5
	B	48	24,0		
	C	48	22,7		
	média		23,2		
	nulo A	48	19,6		
4822.2.10	A	48	22,5	2,3	10,9
	B	48	24,4		
	média		23,5		
	nulo A	48	20,9		
	nulo B	48	21,4		

Evento	Planta	<i>n</i>	Óleo médio (%)	Pontos % Δ	% Δ
	média		21,2		

[0367] Seleção de sementes T2 homozigóticas para conjuntos de expressão de DGAT1 de *Yarrowia* derivado de KS349 e DGAT2 derivado de KS362 não mais segregou com relação ao fenótipo com elevado teor de ácido oleico ($\geq 22\%$ oleico) associado à expressão de genes DGAT de *Yarrowia*. O teor de óleo de 48 sementes (ou todas as sementes disponíveis caso fossem disponíveis menos de 48 sementes) foi medido por meio de NMR. Para cada evento, foram plantadas sementes segregantes nulas T1 que não exibiram elevação de ácido oleico e foram colhidas sementes T2 desses segregantes nulos de plantas cultivadas na mesma câmara de crescimento utilizada para cultivo de plantas T1 homozigóticas para os transgenes de DGAT. O teor de óleo de sementes derivadas de seleções segregantes nulas e linhagens homozigóticas para o transgene DGAT é exibido na Tabela 20.

TABELA 20

**TEOR DE ÓLEO DE SEMENTES SEGREGANTES NULAS E SEMENTES TRANSGÊNICAS
DERIVADAS DE PLANTAS T1 DE SOJA TRANSGÊNICA QUE SÃO HOMOZIGÓTICAS PARA
TRANSGENES COM OS GENES DGAT1 E DGAT2 DE *YARROWIA***

Evento	Planta	<i>n</i>	Óleo médio (%)	Pontos % Δ	% Δ
4818.1.2	A	35	23,9	3,8	18,5
	B	48	24,1		
	média		24,0		
	nulo A	48	20,1		
	nulo B	48	20,4		
	média		20,3		

Evento	Planta	<i>n</i>	Óleo médio (%)	Pontos % Δ	% Δ
4818.1.3	A	48	24,4	4,5	22,8
	B	48	24,4		
	C	48	24,3		
	média		24,4		
	nulo A	48	20,2		
	nulo B	48	19,5		
	média		19,9		
4818.1.5	A	48	24,4	4,8	24,2
	B	13	24,4		
	C	48	25,1		
	média		24,6		
	nulo A	48	19,4		
	nulo B	48	20,2		
	média		19,8		
4818.2.6	A	46	24,2	3,1	14,4
	nulo A	11	21,4		
	nulo B	48	20,9		
	média		21,2		

[0368] Resumidamente, os resultados da câmara de crescimento exibem excelente capacidade de herança do aumento das características de óleo associadas à sobreexpressão de um único gene de DGAT de *Yarrowia* ou coexpressão de genes DGAT de *Yarrowia* em sementes de soja.

[0369] O aumento de óleo (quando comparado com sementes segregantes nulas) associado à expressão de um único gene de DGAT de *Yarrowia* é de pelo menos 10,9% e até 25,1%.

[0370] O aumento de óleo (quando comparado com semente segregante nula) associado à expressão dos dois genes de DGAT de *Yarrowia* é de pelo menos 14,4% e até 24,2%.

EXEMPLO 13A

ANÁLISE DE EVENTOS TRANSGÊNICOS: CAMPO

[0371] O presente exemplo descreve medições do teor de óleo de soja derivado de plantas T2 que foram homozigóticas ou heterozigóticas para transgenes que compreendem YL DGAT1 ou YL DGAT2 ou os dois genes YL DGAT. Plantas T2 foram cultivadas em um ambiente não controlado (campo).

[0372] Semente T1 Vermelho DS positivo de eventos transgênicos gerados com YL DGAT2 (contido em KS 362) e semente segregante nula Vermelho DS negativa DS correspondente foram cultivadas em um campo em Iowa no verão de 2007.

[0373] Sementes T1 com elevado teor de ácido oleico que havia sido gerado por meio de cotransformação com YL DGAT1 e YL DGAT2 e semente segregante nula correspondente com níveis normais de ácido oleico foram cultivadas de forma similar. Sementes T2 foram colhidas de plantas individuais e submetidas a análise de NMR para medir o teor de óleo.

[0374] A Tabela 21 exibe o teor de óleo de 48 sementes positivas Vermelho DS positivas uniformemente derivadas de eventos que foram homozigóticos para o transgene KS362 e o de sementes Vermelho DS negativas de sementes segregantes nulas do mesmo evento cultivadas no mesmo ambiente.

TABELA 21**TEOR DE ÓLEO DE SEMENTES SEGREGANTES NULAS E SEMENTES TRANSGÊNICAS****DERIVADAS DE PLANTAS T1 DE SOJA TRANSGÊNICA CULTIVADAS NO CAMPO QUE****SÃO HOMOZIGÓTICAS PARA TRANSGENES COM O GENE DGAT2 DE YARROWIA**

Evento	Planta	<i>n</i>	Óleo médio (%)	Pontos % Δ	% Δ
4822.1.2	A	48	22,4	2,4	13
	B	48	20,5		
	C	48	21,5		
	E	48	21,7		
	F	48	20,7		
	G	40	19,5		
	H	16	23		
	média		21,3		
	Nulo A	48	18,9		
	Nulo B	48	19		
	Nulo C	48	18,7		
	Nulo D	16	17,9		
	Nulo E	24	20,2		
	média		18,9		
4822.2.11	A	48	22,1	2,6	14
	B	47	21		
	C	48	23,8		
	D	48	21,1		
	E	48	23,1		
	F	48	22		
	G	48	20,4		

Evento	Planta	<i>n</i>	Óleo médio (%)	Pontos % Δ	% Δ
	H	48	20,8		
	I	48	20,3		
	média		21,6		
	Nulo A	48	19,2		
	Nulo B	48	19,5		
	Nulo C	48	18,3		
	média		19,0		
4822.2.10	A	40	21,8	2,6	13,6
	B	48	21,8		
	média		21,8		
	Nulo A	48	18,6		
	Nulo B	48	19,2		
	Nulo C	48	19,2		
	Nulo E	16	19,7		
	Nulo F	48	19,7		
	Nulo G	48	19		
	média		19,2		

[0375] A Tabela 22 exibe o teor de óleo de 48 sementes de segregantes que foram homozigóticos para transgenes YL DGAT1 e YL DGAT2.

[0376] Todas as sementes colhidas dessas seleções de sementes T2 homozigóticas exibiram o elevado teor de ácido oleico associado à expressão de YL DGAT.

[0377] Na Tabela 22, o teor de óleo dessas linhas é comparado com o de sementes segregantes nulas dos mesmos eventos com níveis

inalterados de ácido oleico, derivados de plantas cultivadas no mesmo ambiente.

TABELA 22

TEOR DE ÓLEO DE SEMENTES SEGREGANTES NULAS E SEMENTES TRANSGÊNICAS

DERIVADAS DE PLANTAS T1 DE SOJA TRANSGÊNICA CULTIVADAS EM CAMPO QUE

SÃO HOMOZIGÓTICAS PARA TRANSGENES COM OS GENES DGAT1 E DGAT2 DE

YARROWIA

Evento	Planta	<i>n</i>	Óleo médio (%)	Pontos % Δ	% Δ
4818.1.2	A	37	22,2	3,8	20
	B	48	22,5		
	C	48	22,7		
	D	48	22,6		
	E	48	24,3		
	F	40	21,5		
	média		22,6		
	nulo A	48	17,9		
	nulo B	48	18,9		
	nulo C	48	19,4		
	nulo D	48	19,5		
	nulo E	48	19,7		
	nulo F	48	18,4		
	nulo G	48	17,9		
	média		18,8		
4818.1.3	A	48	23,5	3,5	19
	B	48	22,4		
	C	48	22,8		

Evento	Planta	<i>n</i>	Óleo médio (%)	Pontos % Δ	% Δ
	D	19	21,3		
	E	48	20,5		
	F	48	22,3		
	G	48	22,8		
	H	48	22,5		
	média		22,3		
	nulo A	48	18,4		
	nulo B	48	19,1		
	nulo C	48	17,9		
	nulo D	48	19		
	nulo E	48	19,3		
	nulo F	48	18,3		
	nulo G	48	18,3		
	média		18,6		

[0378] O Exemplo 11 descreve que o evento 4818.1.9 contém um conjunto de expressão intacto para o gene DGAT1 de *Yarrowia*. Três plantas T1 deste evento derivadas de sementes T1 com teor elevado de ácido oleico foram cultivadas no campo em Iowa junto com plantas segregantes nulas laterais derivadas de sementes T1 com teor de ácido oleico inalterado. Sementes T2 de todos os três segregantes transgênicos ainda exibiram segregação do fenótipo de ácido oleico elevado que indica que as linhagens parentais ainda foram heterozigóticas para o transgene DGAT1. Utilizando análise de GC, todas as sementes positivas para transgenes foram identificadas a partir dessas linhas e submetidas à análise de óleo por meio de NMR. Na Tabela 23, o teor de óleo dessas sementes é comparado com o de

sementes segregantes nulas derivadas de plantas T1 cultivadas no mesmo ambiente.

TABELA 23

**TEOR DE ÓLEO DE SEMENTES SEGREGANTES NULAS E SEMENTES TRANSGÊNICAS
DERIVADAS DE PLANTAS T1 DE SOJA TRANSGÊNICA CULTIVADAS EM CAMPO QUE
SÃO HETEROZIGÓTICAS PARA TRANSGENES COM O GENE DGAT1 DE YARROWIA**

Evento	Planta	<i>n</i>	Óleo médio (%)	Pontos % Δ	% Δ
4818.1.9	A	14	20,7	2,0	11
	B	14	19,1		
	C	20	20		
	média		20,0		
	nulo A	40	18,1		
	nulo B	40	17,8		
	média		18,0		

[0379] Em resumo, os resultados de ambiente de campo exibem excelente capacidade de herança da característica de óleo aumentada associada à sobreexpressão de um gene DGAT de *Yarrowia* isolado ou coexpressão dos dois genes de DGAT de *Yarrowia* em semente de soja. O aumento de óleo (quando comparado com semente segregante nula) associado à expressão de um único gene DGAT de *Yarrowia* é de pelo menos 11% e até 14%. O aumento de óleo (quando comparado com semente segregante nula) associado à expressão dos dois genes DGAT de *Yarrowia* é de pelo menos 19% e até 20%.

EXEMPLO 13B

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE SEMENTES DE SOJA:

[0380] O presente exemplo descreve medições de parâmetros de

composição de sementes tais como o teor de proteína e o teor de carboidratos solúveis de sementes de soja derivadas de eventos transgênicos que expressam genes YL DGAT isolados (YL DGAT2) dos dois genes YL DGAT.

[0381] Foram medidas alterações da composição de sementes de soja associadas à expressão de genes YL DGAT. Com este propósito, as concentrações de proteína, carboidratos solúveis e amido foram medidas conforme segue.

ANÁLISE DE PROTEÍNAS E CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS:

[0382] Sementes de soja secas foram moídas em um pó fino em um moedor Geno e subamostras foram pesadas (até precisão de 0,1 mg) em treze tubos de vidro de 100 mm; os tubos continham fechamentos de tampa de rosca forrados com Teflon®. Foram preparadas três réplicas para cada amostra testada. Os pesos secos de tecido foram calculados por meio de pesagem de subamostras antes e depois da secagem em um forno a ar forçado por dezoito horas a 105 °C. A extração de lipídios foi realizada por meio da adição de parcelas de 2 ml de heptano a cada tubo. Os tubos foram misturados por turbilhonamento e colocados em um banho ultrassônico (VWR Modelo Científico 750D) cheio de água aquecida a 60 °C. As amostras foram sonicadas sob potência plena (cerca de 360 W) por quinze minutos e centrifugadas em seguida (5 min x 1700 g). Os sobrenadantes foram transferidos para limpar treze tubos de vidro de 100 mm e as pelotas foram extraídas mais duas vezes com heptano (2 ml, segunda extração, 1 ml terceira extração) com a reunião dos sobrenadantes de cada extração. Após a extração de lipídios, adicionou-se 1 ml de acetona às pelotas e após a mistura por turbilhonamento, para dispersar completamente o material, eles foram levados até secar em um Speedvac.

ANÁLISE E EXTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS.

[0383] Dois mililitros de etanol a 80% foram adicionados às

pelotas secas de cima. As amostras foram completamente misturadas por turbilhonamento até a dispersão completa do material vegetal no solvente antes da sonicação a 60 °C por quinze minutos. Após a centrifugação, 5 min x 1700 g, os sobrenadantes foram decantados em treze tubos de vidro de 100 mm limpos. Duas outras extrações com etanol a 80% foram realizadas e os sobrenadantes de cada um foram reunidos. As pelotas extraídas foram suspensas em acetona e secos (conforme acima). Um padrão interno β -fenil glucopiranosida (100 μ l de um padrão de 0,5000 +/- 0,0010 g/100 ml) foi adicionado a cada extrato antes da secagem em um Speedvac. Os extratos foram mantidos em um dissecador até análise adicional.

[0384] Os pós secos em acetona de cima foram suspensos em 0,9 ml de tampão de MOPS (ácido 3-N[morfolino]propanossulfônico; 50 mM, 5 mM de CaCl_2 , pH 7,0) contendo 100 U de α -amilase estável no calor (de *Bacillus licheniformis*; Sigma A-4551). As amostras foram colocadas em um bloco de aquecimento (90 °C) por 75 minutos e foram misturadas por turbilhonamento a cada quinze minutos. As amostras foram mantidas em resfriamento em seguida à temperatura ambiente e 0,6 ml de tampão de acetato (285 mM, pH 4,5) contendo 5 U de amiloglicosidase (Roche 110 202 367 001) foram adicionados a cada um. As amostras foram incubadas por quinze a dezoito horas a 55 °C em um banho de água equipado com um agitador recíproco; padrões de amido de batata solúvel (Sigma S-2630) foram incluídos para garantir que a digestão de amido seguisse até o final.

[0385] Após a digestão, os carboidratos liberados foram extraídos antes da análise. Adicionou-se etanol absoluto (6 ml) a cada tubo e, após mistura por turbilhonamento, as amostras foram sonicadas por quinze minutos a 60 °C. As amostras foram centrifugadas (5 min x 1700 g) e os sobrenadantes foram decantados em treze tubos de vidro de 100 mm limpos. As pelotas foram extraídas por outras duas vezes com 3 ml de etanol a 80% e os sobrenadantes

resultantes foram reunidos. Adicionou-se padrão interno (100 µl de β-fenil glicopiranosídeo, conforme acima) a cada amostra antes de secagem em um Speedvac.

PREPARAÇÃO E ANÁLISE DE AMOSTRAS:

[0386] As amostras secas das extrações de amido e solúveis descritas acima foram solubilizadas em piridina anidra (Sigma-Aldrich P57506) contendo 30 mg/ml de hidroxilamina HCl (Sigma-Aldrich 159417). As amostras foram colocadas sobre um agitador orbital (300 rpm) por uma noite e foram aquecidas em seguida por uma hora (75 °C) com mistura por turbilhonamento vigoroso aplicado a cada quinze minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se 1 ml de hexametildissilazano (Sigma-Aldrich H-4875) e 100 µl de ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich T-6508). As amostras foram misturadas por turbilhonamento e os precipitados foram mantidos em deposição antes da transferência dos sobrenadantes para ampolas de amostras de GC.

[0387] Amostras foram analisadas sobre um cromatógrafo de gás Agilent 6890 equipadas com uma coluna capilar DB-17MS (filme de 15 m x 0,32 mm x 0,25 µm). As temperaturas de entrada e do detector foram ambas de 275 °C. Após a injeção (2 µl, divisão 20:1), a temperatura de coluna inicial (150 °C) aumentou para 180 °C à velocidade de 3 °C/minuto e, em seguida, a 25 °C/minuto até uma temperatura final de 320 °C.

[0388] A temperatura final foi mantida por dez minutos. O gás veículo foi H₂ sob uma velocidade linear de 51 cm/seg. A detecção foi por meio de ionização de chama.

[0389] Realizou-se análise de dados utilizando software Agilent ChemStation. Cada açúcar foi quantificado com relação ao padrão interno e as respostas do detector foram aplicadas para cada carboidrato individual (calculado a partir de padrões conduzidos com cada conjunto de amostras). As

concentrações finais de carboidrato foram expressas com base em peso seco de tecido.

ANÁLISE DE PROTEÍNAS:

[0390] O conteúdo de proteínas foi estimado por meio de análise de combustão em um analisador de combustão Thermo Finnigan Flash 1112EA. Amostras com 4 a 8 mg, pesadas até uma precisão de 0,001 mg em uma microbalança Mettler-Toledo MX5, foram utilizadas para análise. O teor de proteína foi calculado multiplicando-se % N, determinado pelo analisador, por 6,25. O teor final de proteína foi expresso com base em percentual de peso seco de tecido.

TABELA 24

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE SEMENTES DE SOJA DERIVADAS DE DUAS PLANTAS T1

QUE FORAM UM SEGREGANTE NULO OU HOMOZIGÓTICO PAR UM TRANSGENE YL

DGAT1 YL DGAT2

Evento			Pinitol	Sorbitol	Frutose	Glicose	Mio- inositol	Sacarose	Rafinose	Estaquiose	Total g/kg	Amido	Proteína (%DW)
4818. 1.5	Nulo	Média DP	1,57 0,03	0,26 0,02	4,60 0,18	1,61 0,27	0,27 0,01	47,0 1,6	8,01 0,15	35,88 0,72	99,2 2,0	0,45 0,03	38,6 0,3
4818. 1.5	TG	Média DP	1,31 0,09	0,24 0,00	2,67 0,07	0,79 0,02	0,31 0,01	21,2 0,4	5,08 0,11	32,60 1,21	64,2 1,7	0,03 0,02	43,4 0,2

[0391] As plantas foram cultivadas no mesmo ambiente de câmara de crescimento. A menos que seja indicado em contrário, os valores são relatados como g/kg de DW.

TABELA 25

ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO DE SEMENTES DE SOJA DERIVADAS DE UMA PLANTA T1

QUE FOI HETEROZIGÓTICA PARA UM TRANSGENE YL DGAT2

Evento			Pinitol	Sorbitol	Frutose	Glicose	Mioinositol	Sacarose	Rafinose	Estaquiose	Total g/kg	Amido
4822.2.10	Nulo	Média	1,66	0,17	5,50	2,57	0,28	47,2	6,64	45,0	108,9	0,31
		Desvio padrão	0,12	0,04	1,76	0,87	0,09	0,2	0,68	1,6	3,1	0,05
4822.2.10	TG	Média	2,02	0,19	5,02	1,72	0,33	32,7	6,91	41,4	90,3	0,31
		Desvio padrão	0,06	0,01	0,33	0,18	0,02	1,0	0,18	0,6	1,5	0,11

[0392] A planta foi cultivada em uma câmara de crescimento. Sementes transgênicas YL DGAT e sementes segregantes nulas foram selecionadas com base na expressão de Vermelho DS como um marcador visível. Oito sementes Vermelho DS positivas e Vermelho DS negativas foram combinadas e analisadas conforme descrito acima. A menos que indicado em contrário, os valores são relatados como g/kg de DW.

TABELA 26

ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO DE SEMENTES DE SOJA DERIVADAS DE PLANTAS T1 QUE FORAM HETEROZIGÓTICAS PARA UM TRANSGENE YL DGAT2 OU YL DGAT1 YL

DGAT2

Evento			Pinitol	Sorbitol	Frutose	Glicose	Mio- inositol	Sacarose	Rafinose	Estaquiose	Total g/kg	Amido	Proteína (%DW)
4822. 2.10	Nulo	Média DP	2,44 0,05	0,26 0,01	1,16 0,05	1,12 0,02	0,44 0,00	57,7 0,7	8,5 0,4	39,0 0,5	110,6 1,3	3,20 0,55	41,5 0,5
4822. 2.10	TG	Média DP	1,89 0,06	0,35 0,09	0,82 0,14	0,67 0,06	0,32 0,01	29,7 1,5	5,5 0,1	31,7 0,5	70,9 2,2	1,00 0,23	46,1 0,7
4818. 1.2	Nulo	Média DP	1,79 0,02	0,51 0,01	1,17 0,13	1,12 0,13	0,37 0,01	49,8 2,6	6,1 0,4	42,0 2,4	102,8 5,1	0,51 0,07	44,5 2,2
4818. 1.2	TG	Média DP	1,87 0,05	0,32 0,02	0,71 0,05	0,52 0,01	0,40 0,02	35,7 0,8	6,0 0,2	37,7 1,5	83,2 2,5	0,35 0,08	46,4 0,2

[0393] As plantas foram cultivadas no campo. Sementes transgênicas YLD DGAT e sementes segregantes nulas foram selecionadas com base na expressão de Vermelho RS (4822.2.10) como um marcador visível ou teor de ácido oleico elevado determinado por meio de análise de GC (4818.1.2). Oito sementes positivas para transgene e negativas para transgene foram combinadas e analisadas conforme descrito acima. A menos que indicado em contrário, os valores são relatados como g/kg de DW.

[0394] As Tabelas 24 a 26 ilustram que a expressão de um ou dois genes YL DGAT em diferentes ambientes (câmara de crescimento, campo) é associada a uma alteração consistente da composição de sementes que é caracterizada por uma redução de carboidratos solúveis, nomeadamente

uma redução da sacarose e, até menor ponto, uma redução da estaquiose. De forma mais importante, não há redução do teor de proteína observado ao aumentar-se o acúmulo de óleo por meio da expressão de genes YL DGAT.

EXEMPLO 14

MEDIÇÕES DA ATIVIDADE DE DGAT EM SEMENTES EM DESENVOLVIMENTO E

EMBRIÕES SOMÁTICOS:

[0395] O presente exemplo descreve a construção de vetores de expressão de soja que compreendem DGAT2 isolado de *Yarrowia* ou DGAT2 e DGAT1 de *Yarrowia*, a expressão desse(s) gene(s) em sementes de soja ou embriões somáticos e a atividade de enzima DGAT nestes tecidos.

CONSTRUÇÃO DE PKR1234 QUE COMPREENDE YL DGAT2:

[0396] O fragmento de NotI de KS362 (SEQ ID Nº 52), que contém o YL DGAT2 foi clonado no fragmento de NotI de pKR72 (SEQ ID Nº 26; Exemplo 4) para produzir pKR1234 (SEQ ID Nº 68).

CONSTRUÇÃO DE PKR1236 QUE COMPREENDE YL DGAT1 E DGAT2:

[0397] O promotor Gy1 de glicinina foi amplificado por meio de PCR a partir de pZBL119 (que é descrito no documento WO 2004/071467, cujo teor é incorporado ao presente como referência) utilizando os primers oSGly-2 (SEQ ID Nº 69) e oSGly-3 (SEQ ID Nº 70). O fragmento de PCR resultante foi subclonado no vetor de clonagem intermediário PCR-Script AMP SK(+) (Stratagene), de acordo com o protocolo do fabricante, para produzir o plasmídeo pSGly32 (SEQ ID Nº 71).

[0398] O fragmento *Pst*I/*Not*I do plasmídeo pSGly32 (SEQ ID Nº 71), que contém o promotor Gy1, foi clonado no fragmento *Pst*I/*Not*I do plasmídeo pKR142 (que é descrito no documento WO 2004/071467, que contém a região de término de transcrição de legumina A 2 3', um gene de resistência à ampicilina e origem bacteriana, para produzir pKR264 (SEQ ID Nº 72). Desta forma, o vetor pKR264 contém um local *Not*I ladeado pelo promotor

para o gene Gy1 de glicinina e a região de término de transcrição de legumina A 2 3' (conjunto Gy1/NotI/legA2).

[0399] O fragmento NcoI/XbaI de KS349 (SEQ ID Nº 48), que contém DGAT1 de *Yarrowia*, foi clonado nos locais NcoI/XbaI de pKR908 (Patente US 20080095915), que contém locais NcoI/XbaI ladeados por locais NotI, para produzir pKR1212 (SEQ ID Nº 73).

[0400] O fragmento NotI de pKR1212 (SEQ ID Nº 73), que contém o gene DGAT1 de *Yarrowia*, foi clonado no local NotI de pKR264 (SEQ ID Nº 72) para produzir pKR1235 (SEQ ID Nº 74).

[0401] O fragmento BsiWI de pKR1235 (74), que contém o gene DGAT1 de *Yarrowia*, foi clonado no local BsiWI de pKR1234 (SEQ ID Nº 68) para produzir pKR1236 (SEQ ID Nº 75).

TESTES DE DGAT SOBRE EXTRATOS MICROSSÔMICOS A PARTIR DE SEMENTE T2

EM DESENVOLVIMENTO:

[0402] Cultivos de suspensão embriogênica de soja (cv. Jack) foram transformados com KS362 conforme descrito no presente (Exemplo 6), que compreende DGAT2 de *Yarrowia*, conforme descrito no presente e sementes T1 de plantas de soja AFS4822.1.13.1 (semente denominada 7GR11-58) e AFS4822.2.10.1 (semente denominada 7GR11-66) foram plantadas e as plantas cultivadas conforme descrito no Exemplo 12. Nestes dois eventos, descobriu-se que a concentração de óleo de sementes positivas para transgenes é elevada quando comparado com semente segregante nula do mesmo evento.

[0403] De forma similar, cultivos de suspensão embriogênica de soja (cv. Jack) foram cotransformados com KS362 (que compreende YL DGAT2) e KS349 (que compreende YL DGAT1) conforme descrito no presente (Exemplo 6). Sementes T1 positivas para transgenes do evento AFS4818.1.2.1 são representadas pela semente 7GR11-2. Neste evento, a concentração de

óleo de sementes positivas para transgene foi considerada elevada quando comparado com sementes segregantes nulas do mesmo evento (Exemplo 6). Sementes T1 segregantes nulas negativas para transgene derivadas de AFS488.1.2.1 e AFS4818.1.3.1 são representadas por 7GR11-7 e 7GR11-15. Estas sementes foram plantadas e as plantas cultivadas conforme descrito no Exemplo 12.

[0404] Cerca de um grama de sementes T2 foi recolhido de plantas selecionadas trinta dias após o florescimento (DAF), congelado rapidamente em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C até estar pronto para o processo. Após a moagem de um grama de tecido de sementes congelado em nitrogênio líquido em um pilão e almofariz, foram adicionados 3 ml de tampão de homogeneização de plantas (300 mM de sacarose; 1 mM de EDTA; 10 mM de Tris HCl, pH 8,0; 1 mM de DTT; 0,1% polivinilpolipirrolidina) e o tecido foi adicionalmente homogeneizado utilizando um homogeneizador de politrons por um minuto. Os fragmentos foram recolhidos por meio de filtração a vácuo através de três camadas de pano de embrulhar queijos seguida por filtração através de uma camada de papel Miracloth. O filtrado resultante foi centrifugado por quinze minutos duas vezes a 1500 x g e o sobrenadante resultante foi centrifugado em seguida a 100.000 x g por sessenta minutos. A pelota resultante reagiu em cerca de 0,5 a 1 ml de tampão de microssomos (100 mM de fosfato de potássio, pH 7,2) pipetando-se suavemente, seguido por nova suspensão adicional em um homogeneizador Dounce revestido com Teflon dimensionado de 2 ml. As concentrações de proteína foram determinadas utilizando reagente Bradford (Sigma-Aldrich) e microssomos foram congelados rapidamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até serem testados.

[0405] Os testes de DGAT foram conduzidos por cinco minutos a 25 °C em tampão de teste de planta (500 mM de Tricina, pH 7,8; 28 mM de

cloreto de sódio; 0,06% CHAPS), com 20 μ M de oleoilcoenzima A 1- 14 C-marcada (50 mCi/mmol, Perkin Elmer), 1,5 mM de dioleoilglicéride (Sigma-Aldrich) e 20 μ g de proteína microssomal em um volume de reação total de 100 μ l. Cada reação foi iniciada por meio da adição das membranas microssomais ao restante dos componentes de reação. Os testes foram encerrados por meio da adição de 1 ml de isopropanol quente (75 °C) e aquecimento a 75 °C por dez minutos. Os testes foram resfriados à temperatura ambiente, adicionou-se 1,5 ml de hexano e as amostras foram misturadas. As fases foram separadas por meio de centrifugação sob baixa velocidade após a adição de 1,25 ml de 500 mM de sulfato de sódio e a fase superior foi transferida para um outro tubo de vidro. A fase superior foi seca em seguida sob gás nitrogênio. O lipídio de cada teste foi novamente dissolvido em 75 μ l de hexano bloqueado com 1 μ l de óleo de soja. Aplicou-se lipídio a uma placa de TLC Partisil K6 Sílica Gel 60 A (Whatman, espessura de 250 μ m, 20 cm x 20 cm) e os triglicérides foram separados de outros lipídios por meio de desenvolvimento com 80:20:1 (v/v/v) hexano: dietil éter: ácido acético. Triacilglicerol foi visualizado e marcado por meio de manchas claras em vapor de iodo em um tanque. A placa foi removida do tanque de iodo e, após o desvanecimento da mancha, o triacilglicerol foi raspado e a radioatividade foi determinada por meio de contagem da cintilação de líquidos e expressa na forma de dpm por minuto.

[0406] A atividade total foi determinada como a quantidade de ácido oleico radiomarcado incorporado em triacilglicerol por minuto por mg de proteína utilizando a fórmula a seguir: $([\text{dpm}] / [2200000 \text{ dpm/uCi}] / [50 \text{ uCi/mol}] / [5 \text{ min}] / [0,02 \text{ mg de proteína}] \times [1000 \text{ nmol}/\mu\text{mol}])$. As atividades de DGAT para cada uma das amostras descritas são exibidas na Tabela 27.

TABELA 27**ATIVIDADES DE DGAT PARA SEMENTES T2 EM DESENVOLVIMENTO SELECIONADAS**

Exp.	Plasm.(s)	DGAT(s)	Evento	Planta T1	Semente T1	Fenótipo de óleo de semente T1	Ativ. DGAT de semente em desenv. T2 (nmol. min- 1.mg-1)
4818	KS362 KS349	DGAT2 DGAT1	AFS 4818.1.2	AFS 4818. 1.2.1	7GR11-2	DGAT	2,8
4818	KS362 KS349	DGAT2 DGAT1	AFS 4818.1.2	AFS 4818. 1.2.1	7GR11-7	nulo	0,4
4818	KS362 KS349	DGAT2 DGAT1	AFS 4818.1.3	AFS 4818. 1.3.1	7GR11- 15	nulo	0,4
4822	KS362	DGAT2	AFS 4822.2.10	AFS 4822. 2.10.1	7GR11- 66	DGAT	1,6

TESTES DE DGAT SOBRE EXTRATOS MICROSSOMAIIS DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE**SOJA:**

[0407] Cultivos de suspensão embriogênica de soja (cv. Jack)

foram transformados com pKR1234 (SEQ ID N° 68), que compreende DGAT2 de *Yarrowia* e possui número de experimento MSE2181 ou com pKR1236 (SEQ ID N° 75), que compreende DGAT2 e DGAT1 de *Yarrowia* e possui experimento número MSE2182. Os eventos foram selecionados e os embriões somáticos amadureceram em SHaM conforme descrito no Exemplo 5.

[0408] Após duas semanas de maturação em SHaM, cerca de 1 g de tecido de cada evento foi congelado em nitrogênio líquido e tecido foi moído com um pilão e almofariz conforme descrito para semente em desenvolvimento de soja. Uma pequena quantidade de tecido moído (cerca de 100 mg) foi liofilizada por uma noite e o tecido remanescente foi armazenado a -80 °C.

[0409] As concentrações de óleo foram determinadas sobre cerca de 10 mg de tecido liofilizado de cada evento utilizando o método GC e 17:0 padrão interno exatamente conforme descrito no Exemplo 5 e os resultados de concentrações de óleo e teor de ácido oleico (percentual do total de FAME) são exibidos na Tabela 28. Foram elaboradas preparações de proteínas microsomais, as concentrações de proteínas foram determinadas e foram conduzidos testes de DGAT sobre eventos selecionados determinados para que possuam uma faixa de concentrações de óleo exatamente conforme descrito anteriormente para tecido de sementes. Os resultados de testes de DGAT também são exibidos na Tabela 28.

TABELA 28

TEOR DE ÁCIDO OLEICO, ÁCIDO GRAXO ESTERIFICADO E ATIVIDADES DE DGAT DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA TRANSFORMADOS COM pKR1234 OU pKR1236

MSE2181-pKR1234 (YL DGAT2)			
Evento nº	FAME (% DCW)	Ácido oleico (% total FAME)	Atividade de DGAT (nmol.min⁻¹.mg⁻¹)
8	8,9	31,9	3,6

5	7,3	33,8	4,5
3	6,6	32,6	2,5
9	6,2	30,7	2,5
7	6,1	30,4	
16	5,8	25,4	1,6
12	5,6	26,1	
15	5,4	26,7	2,8
4	4,6	22,5	0,7
11	4,2	22,7	0,5
14	4,0	21,2	
13	3,8	23,2	1,8
6	3,5	25,3	
10	3,2	21,2	0,5
MSE2182-pKR1236 (YL DGAT2/YL DGAT1)			
2	10,9	38,8	6,3
7	10,8	38,8	
4	10,3	38,4	5,1
3	10,0	38,0	
8	9,8	38,1	4,4
17	9,6	29,3	
10	8,6	33,3	5,7
28	8,2	36,3	
13	8,1	43,6	
5	8,0	25,4	
20	8,0	36,4	
12	7,7	29,3	4,8
26	7,6	30,5	

24	7,2	33,4	
9	6,3	20,4	0,7
29	6,3	29,8	
21	6,1	31,1	
19	5,7	32,5	
6	5,6	21,7	0,5
23	5,6	33,5	
16	5,4	26,3	
25	5,1	20,3	
14	5,1	26,2	0,9
1	5,0	24,9	
18	4,9	22,2	
30	4,5	17,0	0,4
27	3,7	19,7	
15	3,2	21,6	
11	2,9	16,6	2,5
22	2,8	20,7	

[0410] Eventos transformados com pKR1234 e que contêm algumas das concentrações de óleo mais altas apresentaram aumentos da atividade de DGAT de até nove vezes quando comparado com os eventos que contêm níveis de óleo do tipo selvagem. Eventos transformados com pKR1236 e que contêm algumas das concentrações de óleo mais altas apresentaram aumentos da atividade de DGAT de até 15,8 vezes quando comparado com os eventos que possuem níveis de óleo do tipo selvagem.

[0411] Cultivo de suspensão embriogênica de soja (cv. Jack) também foi transformado com KS364 (SEQ ID N° 63), que compreende DGAT2 e DGAT1 de *Yarrowia* (Experimento n° MSE2134) e eventos individuais foram

analisados para determinar o perfil de ácido graxo e concentração de óleo descritos no Exemplo 5. Com base nesses dados, um evento (Evento 54) que contém alto teor de ácido oleico (32,83% do total de ácidos graxos) e concentrações de óleo (12,5% DCWt) e um evento (Evento 33) que contém níveis de ácido oleico do tipo selvagem (15,52% do total de ácidos graxos) e concentrações de óleo (8,2% DCWt) foram selecionados para testes de DGAT. Cultivo de suspensão embriogênica transformada de cada evento foi acumulado em meios SB 196 e embriões amadurecidos em SHaM conforme descrito no Exemplo 5.

[0412] Após duas semanas de maturação em SHaM, cerca de 1 g de tecido de cada evento foi congelado em nitrogênio líquido, foram elaboradas preparações de proteína microssomal e foram conduzidos testes de DGAT em cada evento exatamente conforme descrito anteriormente e os resultados são exibidos na Tabela 29. O total de lipídios foi também extraído e as concentrações de ácido oleico e óleo foram determinadas conforme descrito abaixo e os resultados são relatados na Tabela 29.

TABELA 29

TEOR DE ÁCIDO OLEICO E ÁCIDO GRAXO ESTERIFICADO E ATIVIDADES DE DGAT DE EMBRIÕES DE SOJA SOMÁTICOS TRANSFORMADOS COM KS364

KS364 (DGAT2/DGAT1)			
Evento nº	FAME (% DCW)	Ácido oleico (% total FAME)	Atividade de DGAT (nmol.min⁻¹.mg⁻¹)
33	8,2	15,5	0,3
54	12,7	32,1	3,2

[0413] O evento que contém alta concentração de óleo (Evento

54) apresentou aumentos da atividade de DGAT de 10,7 vezes quando comparado com o evento que contém níveis de óleo de tipo selvagem (Evento 33).

EXEMPLO 15

ANÁLISE DE FRAÇÕES DE LIPÍDIOS DE SEMENTES TRANSGÊNICAS E EMBRIÕES

SOMÁTICOS QUE EXPRESSAM GENES DGAT:

[0414] Embriões somáticos de soja transformados com KS364 a partir de um evento com concentrações de óleo e ácido oleico de tipo selvagem (Evento 33) e de um evento com altas concentrações de óleo e ácido oleico (Evento 54) foram liofilizados por 48 horas e o tecido foi moído utilizando um genomoedor exatamente conforme descrito no Exemplo 5.

EXTRAÇÃO TOTAL DE LIPÍDIOS:

[0415] O total de lipídios foi extraído de cada evento por meio do método de Bligh, E. G. e Dyer, W. J. (*Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917 (1959)) com algumas modificações. Resumidamente, cerca de 100 mg de tecido moído de cada evento foram adicionados a um tubo de ensaio de 16 mm x 125 mm com uma tampa de rosca forrada com teflon. Adicionou-se uma mistura de metanol e clorofórmio 2:1 (6 ml) e a amostra foi extraída com suave mistura por uma hora, após o quê foram adicionados 2 ml de clorofórmio, seguidos por mistura contínua por trinta minutos. Em seguida, foram adicionados 3,6 ml de água, o tubo foi turbilhonado vigorosamente e as fases foram separadas por meio de centrifugação em uma centrífuga clínica. A camada orgânica inferior foi suavemente removida para um segundo tubo de ensaio de vidro e as camadas aquosas superiores foram novamente extraídas com 2 ml de clorofórmio. A centrifugação foi repetida e a fase orgânica inferior foi combinada com a primeira fase orgânica. Amostras foram secas sob um fluxo de nitrogênio a 50 °C, o total de lipídio foi estimado por meio de pesagem e o lipídio foi dissolvido em clorofórmio:metanol 6:1 até uma concentração de

cerca de 10 mg/ml. Análise de FAME foi conduzida sobre cerca de 50 µg de cada amostra utilizando o procedimento de ácido sulfúrico e metanol descrito no presente (Exemplo 4) e os resultados são exibidos na Tabela 30.

SEPARAÇÃO DE LIPÍDIOS POLARES E NEUTROS:

[0416] Colunas de extração de fases sólidas de aminopropila Sep-pak (Waters; colunas de 6 cc; WAT054560) foram equilibradas com 5 ml de metanol, seguidos por 5 ml de metanol:clorofórmio 1:1 seguidos por 5 ml de clorofórmio. Cerca de 5 mg de lipídio total em clorofórmio:metanol 6:1 foram adicionados a cada coluna, seguidos por cinco parcelas de 1 ml de clorofórmio para eluir lipídios neutros e todas as frações foram recolhidas, combinadas e secas sob fluxo de nitrogênio a 50 °C. Lipídios polares foram eluídos em seguida de cada coluna utilizando cinco parcelas de 1 ml de metanol:clorofórmio 1:1 seguidas por cinco parcelas de 1 ml de metanol e todas as frações foram combinadas e secas sob nitrogênio. Lipídios neutros foram dissolvidos em cerca de 1 ml de CHCl₃:MeOH 6:1 e lipídios polares foram dissolvidos em cerca de 200 µl de CHCl₃:MeOH 6:1. Conduziu-se análise de FAME sobre cerca de 50 µg de lipídios neutros utilizando o procedimento de ácido sulfúrico e metanol descrito no presente (Exemplo 4) e os resultados são exibidos na Tabela 30.

SEPARAÇÃO DE TAG, PC E PE POR MEIO DE TLC:

[0417] Cerca de 100 µl de extrato de lipídio neutro foram carregados a 2 cm do fundo de uma placa TLC Partisil K6 Sílica Gel 60 A (Whatman, espessura de 250 µm, 20 cm x 20 cm). De forma similar, cerca de 200 µl da fração de lipídio polar foram carregados sobre a mesma placa de TLC. Soluções padrão (10 mg/ml em clorofórmio:metanol 6:1) de TAG, PC e PE também foram colocadas sobre as placas. As placas de TLC foram desenvolvidas em CHCl₃:MeOH:AcOH 65:35:8 até que a frente do solvente estivesse a meio caminho acima da placa. As placas de TLC foram secas em

ar em seguida por dez minutos e completamente desenvolvidas em 70:30:1 (v/v/v) hexano: dietil éter: ácido acético. Os padrões foram visualizados por meio de manchas claras com vapor de iodo e faixas correspondentes para TAG, PC e PE foram cortadas da placa de TLC. Sílica gel contendo cada espécie de lipídio foi derivada diretamente com ácido sulfúrico e metanol conforme descrito no presente (Exemplo 4) e os resultados são exibidos na Tabela 30.

ANÁLISE DA POSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE TAG

[0418] Os perfis de ácidos graxos da posição sn2 de TAG foram determinados utilizando lipase pancreática suína para remover grupos acila da posição sn1 e sn3 apenas de TAG, seguida por transesterificação do monoacilglicéride (MAG) resultante produzido. Cerca de 5 mg de extrato de lipídio neutro foram suspensos em 2 ml de 1M Tris.HCl, pH 8,0 junto com 0,2 ml de cloreto de cálcio a 2,2% e 0,5 ml de sais de bile a 0,05% em um tubo de ensaio com tampa de rosca de vidro. O lipídio foi incubado a 37 °C por cinco minutos, 5 mg de lipase pancreática suína foram adicionados diretamente e a suspensão foi incubada com agitação a 37 °C por vinte minutos. Após a incubação, a reação foi encerrada com a adição de 1 ml de etanol seguido por 1 ml de 6 M HCl. Após a mistura, foram adicionados 2,5 ml de dietil éter, as fases foram separadas por meio de centrifugação e a camada orgânica superior foi cuidadosamente removida. A extração de dietil éter foi repetida e a fase de dietil éter superior foi combinada com a primeira. Após secagem sobre sulfato de sódio anidro, o dietil éter foi evaporado sob um fluxo de nitrogênio a 50 °C e o lipídio resultante foi dissolvido em 200 µl de clorofórmio e metanol 6:1. O lipídio foi carregado sobre uma placa de TLC Partisil K6 junto com padrões de triacilglicéride (TAG), diacilglicéride (DAG), monoacilglicéride (MAG) e ácido graxo livre (FFA) e a placa de TLC foi desenvolvida conforme descrito no presente. Em seguida, os padrões foram visualizados com

manchas de iodo claras e a faixa de MAG foi cortada e derivada com metanol e ácido sulfúrico conforme descrito anteriormente no presente. Os resultados para o perfil de ácidos graxos de FAME da faixa de MAG, que representa o perfil de ácido graxo da posição sn2 de TAG (ou seja, o grupo acila sobre C2 de glicerol), junto com as posições sn1 e sn3 calculadas, são exibidos na Tabela 30. Na Tabela 30, o percentual de ácido graxo total para cada ácido graxo (ou seja, 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3) nas posições sn1 e sn3 de TAG é calculado com a fórmula a seguir: $= ([TAGx] - [sn2x]/3) * 3/2$; em que o x indica o ácido graxo de interesse.

TABELA 30

COMPOSIÇÃO DE ÁCIDO GRAXO DE VÁRIAS ESPÉCIES DE LIPÍDIOS E DISTRIBUIÇÃO DE POSIÇÕES EM TAG

Amostra	Evento	% Óleo	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
Extrato total	33	8,2	15,6	3,9	15,5	50,8	14,2
	54	12,7	10,5	4,7	32,1	43,9	8,8
Lipídios neutros	33	8,2	14,4	3,7	17,0	52,5	12,4
	54	12,7	9,8	5,3	36,0	42,3	6,6
TAG	33	8,2	18,2	4,8	20,8	47,4	8,7
	54	12,7	11,8	5,8	40,7	37,0	4,6
PC	33	8,2	34,1	10,6	17,2	33,8	4,3
	54	12,7	21,5	10,0	32,1	33,7	2,7
PE	33	8,2	41,1	6,8	13,4	25,9	12,8
	54	12,7	45,8	9,8	21,9	15,3	7,1
TAG-sn1	33	8,2	1,0	0,3	14,9	72,7	11,0
	54	12,7	1,0	0,5	24,0	67,1	7,4
TAG-sn1,3 (calculado)	33	8,2	26,8	7,0	23,8	34,9	7,5
	54	12,7	17,3	8,5	49,1	22,0	3,2

[0419] Alterações dos perfis de ácidos graxos associados à expressão de YL DGAT observada em TAG também são observadas em lipídios polares.

EXEMPLO 16

VARIANTES DE DGAT DE *YARROWIA* COM SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS ALTERADA:

[0420] A presente exemplo descreve a criação de formas mutantes de DGAT2 de *Yarrowia*, clonando-as em um vetor de expressão de levedura e testando frações de proteína microssômica para determinar a atividade de DGAT.

CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO DE *SACCHAROMYCES* QUE CONTÊM

DGAT2s DE *YARROWIA* MUTANTES:

[0421] DGAT2 de *Yarrowia* foi amplificado a partir de pKR1234 (SEQ ID N° 68; Exemplo 14) com primers de oligonucleotídeos oYDG2-1 (SEQ ID N° 76) e oYDG2-2 (SEQ ID N° 77), utilizando DNA Polimerase de Alta Fidelidade Phusion® (Cat. n° F553S, Finnzymes Oy, Finlândia) seguindo o protocolo do fabricante. O fragmento de DNA resultante foi clonado no vetor de clonagem pCR-Blunt® utilizando o Kit de Clonagem de PCR Zero Blunt® (Invitrogen Corporation), seguindo o protocolo do fabricante, para produzir pKR1254 (SEQ ID N° 78).

[0422] Um códon isolado na sequência DGAT2 de *Yarrowia*, que codifica o aminoácido Y326 na sequência de aminoácidos correspondente SEQ ID N° 10, foi alterado utilizando o Kit de Mutagênese Dirigida a Local Quickchange® (Cat. n° 200518, Stratagene, La Jolla CA) com oligonucleotídeos YID2_Y326F-5 (SEQ ID N° 79) e YID2_Y326F-3 (SEQ ID N° 80), seguindo o protocolo do fabricante. Após extenso sequenciamento, um clone que codifica uma sequência de aminoácidos que é idêntica à DGAT2 de *Yarrowia* (SEQ ID N° 10), exceto pelo fato de que Y326 foi alterado para F326, foi selecionado para estudo adicional. Este clone foi designado pKR1254_Y326F (SEQ ID N°

81). A sequência de nucleotídeos para sequência de codificação alterada (YIDGAT2_Y326F) é descrita em SEQ ID Nº 82 e a sequência de aminoácidos correspondente é descrita em SEQ ID Nº 83.

[0423] Um único códon na sequência de DGAT2 de *Yarrowia*, que codifica o aminoácido Y326 na sequência de aminoácidos correspondente SEQ ID Nº 10, foi alterado utilizando o kit de mutagênese dirigida a local Quickchange® (Cat. nº 200518, Stratagene, La Jolla CA) com oligonucleotídeos YID2_Y326L-5 (SEQ ID Nº 84) e YID2_Y326L-3 (SEQ ID Nº 85), seguindo o protocolo do fabricante. Após extenso sequenciamento, um clone que codifica uma sequência de aminoácidos que é idêntica ao DGAT2 de *Yarrowia* (SEQ ID Nº 10), exceto pelo fato de que Y326 foi alterado para L326, foi selecionado para estudo adicional. Este clone foi denominado pKR1254_Y326L (SEQ ID Nº 86). A sequência de nucleotídeos para sequência de codificação alterada (YIDGAT2_Y326L) é descrita em SEQ ID Nº 87 e a sequência de aminoácidos correspondente é descrita em SEQ ID Nº 88.

[0424] Um único códon na sequência de DGAT2 de *Yarrowia*, que codifica o aminoácido R327 na sequência de aminoácidos correspondente SEQ ID Nº 10, foi alterado utilizando o Kit de Mutagênese Dirigida a Local Quickchange® (Cat. nº 200518, Stratagene, La Jolla CA) com os oligonucleotídeos YID2_R327K-5 (SEQ ID Nº 89) e YID2_R327K-3 (SEQ ID Nº 90), seguindo o protocolo do fabricante. Após extenso sequenciamento, um clone que codifica uma sequência de aminoácidos que é idêntica ao DGAT2 de *Yarrowia* (SEQ ID Nº 10), exceto pelo fato de que R327 foi alterado para K327, foi selecionado para estudo adicional. Este clone foi denominado pKR1254_R327K (SEQ ID Nº 91). A sequência de nucleotídeos para sequência de codificação alterada (YIDGAT2_Y326L) é descrita em SEQ ID Nº 92 e a sequência de aminoácidos correspondente é descrita em SEQ ID Nº 93.

[0425] Os fragmentos de NotI de pKR1254, pKR1254_Y326F,

pKR1254_Y326L ou pKR1254_R327K, em que cada qual contém uma versão mutante ou de tipo selvagem de YIDGAT2, foram clonados no local NotI de pY75 (SEQ ID Nº 3; Exemplo 1) para produzir pY191 (SEQ ID Nº 94), pY192 (SEQ ID Nº 95), pY193 (SEQ ID Nº 96) ou pY194 (SEQ ID Nº 97), respectivamente.

TESTE DE ATIVIDADE DE DGAT DE DGAT2s DE YARROWIA MUTANTES:

[0426] Uma linhagem mutante de *Saccharomyces cerevisiae* em que o gene DGAT2 endógeno (DGA1) sofreu nocaute e possui o genótipo a seguir (BY4741, MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0) foi obtido por meio da Open Biosystems (<http://www.openbiosystems.com/>). Ele foi transformado com pY191, pY192, pY193 ou pY194 e transformadores foram isolados conforme descrito no presente. Três transformadores individuais por transformação foram inoculados em 2 ml de cultivos de meios DOBA suplementados com CSM-leu a 30 °C por dezesseis horas. Células (1 ml) foram transferidos para 50 ml de meio DOBA descrito acima e cultivados a 30 °C por dezesseis horas adicionais. Células foram peletizadas por meio de centrifugação, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até que sejam necessárias para uso.

[0427] Pelotas foram novamente suspensas em 2 ml de tampão de homogeneização de levedura (20 mM de Tris.HCl, pH 8,0; 10 mM de MgCl₂; 1 mM de EDTA; 5% glicerol; 1 mM de DTT; 0,3 M de (NH₄)₂SO₄) e a suspensão foi adicionada a um tubo com tampa de rosca de 2 ml contendo cerca de 1 ml de esferas de vidro de 0,5 mm. Após a remoção de bolsas de ar por meio de turbilhonamento, a nova suspensão foi preenchida até o topo do tubo, o tubo foi tampado e as células foram rompidas com três pulsos de um minuto em um minibatedor de esferas a 5000 rpm com armazenagem sobre gelo por cinco minutos. O homogeneizado de levedura foi centrifugado a 1500 x g por quinze minutos a 4 °C e o sobrenadante resultante foi centrifugado em seguida a 100.000 x g por sessenta minutos. A pelota resultante respondeu em

cerca de 0,2 a 0,5 ml de tampão de microsossomos (100 mM de fosfato de potássio, pH 7,2) pipetando-se suavemente, seguido por nova suspensão adicional em um homogeneizador Dounce revestido com Teflon dimensionado com 2 ml. As concentrações de proteína foram determinadas utilizando reagente Bradford (Sigma-Aldrich) e microsossomos foram congelados rapidamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até que testadas.

[0428] Os testes de DGAT foram conduzidos por um minuto a 25 °C em tampão de teste de levedura (50 mM de fosfato de potássio (pH 7,2)) com 20 µM de oleoilcoenzima A marcada com 1-14C (50 mCi/mmol, Perkin Elmer) e 20 µg de proteína microsomal em um volume total de reação de 100 µl. Cada reação foi iniciada por meio da adição das membranas microsossomais ao restante dos componentes da reação. Os testes foram encerrados e a radioatividade em TAG foi determinada exatamente conforme descrito para os testes de DGAT de plantas, exceto pela fórmula, que foi alterada para refletir um tempo de teste de um minuto (ou seja, $[dpm] / [2200000 \text{ dpm/uCi}] / [50 \text{ uCi/umol}] / [5 \text{ min}] / [0,02 \text{ mg de proteína}] \times [1000 \text{ nmol/umol}]$). As atividades de DGAT para cada uma das amostras, bem como as médias descritas, são exibidas na Tabela 31.

TABELA 31

ATIVIDADES DE DGAT PARA DGA1 TRANSFORMADO COM PY191, PY192, PY193 OU

PY194

Plasmídeo	Mutante	Atividade de DGAT (nmol.min⁻¹.mg⁻¹)	Atividade média de DGAT (nmol.min⁻¹.mg⁻¹)	Desvio padrão
pY191	wt	7,6 10,6	10,4	2,7

		13,0		
pY192	Y326F	6,5 8,4 10,0	8,3	1,7
pY193	Y326L	6,2 10,0 8,2	8,1	1,9
pY194	R327K	5,9 6,0 6,7	6,2	0,4

[0429] A partir da Tabela 31, conclui-se que as alterações de aminoácidos Y326F e Y326L possuem efeito mínimo sobre a atividade de DGAT2 de *Yarrowia* quando testadas em leveduras e esses dois mutantes foram selecionados para expressão em embriões somáticos de soja.

CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO DE SOJA QUE CONTÊM DGAT2s DE *YARROWIA* MUTANTES:

[0430] O fragmento NotI de pKR1254 (SEQ ID Nº 78), pKR1254_Y326F (SEQ ID Nº 81) ou pKR1254_Y326L (SEQ ID Nº 86), que contém formas mutantes ou do tipo selvagem de DGAT2 de *Yarrowia*, foi clonado no fragmento NotI de pKR72 (SEQ ID Nº 26; Exemplo 4) para produzir pKR1256 (SEQ ID Nº 98), pKR1277 (SEQ ID Nº 99) ou pKR1278 (SEQ ID Nº 100), respectivamente.

DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÓLEO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA QUE EXPRESSAM DGAT2s DE *YARROWIA* MUTANTES:

[0431] Cultivo de suspensão embriogênica de soja (cv. Jack) foi transformado com pKR1256 (SEQ ID Nº 98) que compreende DGAT2 de *Yarrowia* do tipo selvagem e possui número de experimento MSE2228,

pKR1277 (SEQ ID Nº 99), que compreende DGAT2_Y326F de *Yarrowia* e possui número de experimento MSE2229 ou pKR1278 (SEQ ID Nº 100), que compreende DGAT2_Y326L e possui número de experimento MSE2230.

[0432] Os eventos foram selecionados e embriões somáticos amadurecidos em SHaM conforme descrito no Exemplo 5.

[0433] As concentrações em óleo foram determinadas para cada evento utilizando o NMR e descritas no presente, os perfis de ácidos graxos foram determinados por meio de GC exatamente conforme descrito no presente e os resultados das concentrações de óleo e teor de ácido oleico (% de FAME total) são exibidos na Tabela 32.

TABELA 32

**CONCENTRAÇÕES DE ÓLEO PARA EMBRIÕES DE SOJA SOMÁTICOS TRANSFORMADOS
COM pKR1256, pKR1277 OU pKR1278**

MSE2228-pKR1256 (wt DGAT2)		
Evento nº	FAME (% DCW)	ácido oleico (% FAME total)
2228-9	14,3	44,4
2228-20	12,6	34,3
2228-3	12,4	39,3
2228-14	12,3	36,8
2228-2	11,7	36,8
2228-15	10,9	35,2
2228-5	10,1	23,3
2228-17	10,0	23,5
2228-24	10,0	27,6
2228-6	9,5	25,2
2228-18	9,5	32,4

MSE2228-pKR1256 (wt DGAT2)		
Evento nº	FAME (% DCW)	ácido oleico (% FAME total)
2228-21	9,0	32,9
2228-12	8,7	22,7
2228-10	8,4	24,3
2228-22	7,5	29,9
2228-8	6,8	21,4
2228-19	6,5	27,3
2228-23	6,4	26,5
2228-7	6,1	22,2
2228-13	6,1	24,0
2228-11	5,2	24,3
2228-4	5,1	18,5
2228-16	4,2	19,3
2228-1	3,2	23,1
média	8,6	28,1
MSE2229-pKR1277 (Y326F)		
Evento nº	FAME (% DCW)	ácido oleico (% FAME total)
2229-6	15,1	43,5
2229-20	14,4	44,3
2229-13	14,4	38,1
2229-21	14,0	36,5
2229-16	13,2	36,3
2229-24	13,1	39,9
2229-23	12,3	42,7

MSE2228-pKR1256 (wt DGAT2)		
Evento nº	FAME (% DCW)	ácido oleico (% FAME total)
2229-3	12,2	41,3
2229-25	12,0	40,4
2229-31	11,9	39,0
2229-18	11,6	40,8
2229-5	11,4	38,7
2229-12	11,3	36,7
2229-10	11,3	35,6
2229-27	10,9	27,8
2229-30	10,7	39,0
2229-15	10,4	36,3
2229-8	9,7	39,5
2229-9	9,4	37,4
2229-22	9,2	22,3
2229-7	8,7	23,0
2229-26	8,4	31,2
2229-17	8,3	38,2
2229-28	7,9	27,2
2229-29	7,8	25,7
2229-1	7,4	32,8
2229-2	5,9	18,6
2229-11	4,6	18,6
2229-19	4,1	22,6
2229-4	4,0	21,2
2229-14	3,1	39,8

MSE2228-pKR1256 (wt DGAT2)		
Evento nº	FAME (% DCW)	ácido oleico (% FAME total)
média	8,8	32,2
MSE2230-pKR1278 (Y326L)		
Evento nº	FAME (% DCW)	ácido oleico (% FAME total)
2230-4	11,6	35,1
2230-21	10,1	22,3
2230-15	9,8	22,4
2230-8	9,7	34,9
2230-29	9,6	33,0
2230-27	9,4	35,6
2230-3	9,4	36,7
2230-19	9,0	34,7
2230-6	8,6	23,6
2230-24	8,5	23,3
2230-18	8,4	35,8
2230-22	7,3	23,3
2230-2	7,0	26,7
2230-14	6,9	25,9
2230-9	6,9	22,9
2230-25	6,8	27,3
2230-7	6,8	37,5
2230-5	6,5	25,6
2230-10	6,4	31,1
2230-30	6,3	24,7

MSE2228-pKR1256 (wt DGAT2)		
Evento nº	FAME (% DCW)	ácido oleico (% FAME total)
2230-26	6,3	23,4
2230-17	6,3	25,2
2230-20	6,3	19,5
2230-13	5,8	22,3
2230-12	5,7	21,7
2230-23	5,6	25,1
2230-11	5,5	20,7
2230-1	5,4	26,3
2230-16	5,3	24,0
2230-28	4,6	20,4
2230-31	4,3	18,3
média	6,5	25,4

[0434] Em embriões de soja somáticos, uma variante da proteína YL DGAT2 que conduz a mutação Y326F aumenta as concentrações de óleo e altera o perfil de ácidos graxos do óleo pelo menos até o mesmo ponto do DGAT2 de *Yarrowia* do tipo selvagem.

EXEMPLO 17

EXPRESSÃO DE GENES DGAT OTIMIZADOS:

[0435] Sequências que codificam genes YL DGAT1 e YL DGAT2 que são otimizados para expressão em plantas de soja são descritas em SEQ ID Nº 64 e SEQ ID Nº 66. O projeto destas sequências é descrito no Exemplo 9. Moléculas de DNA com essa sequência de DNA ladeadas por locais de restrição Not I foram sintetizadas por meio de DNA 2.0 (Califórnia, Estados Unidos). DNA de plasmídeo com os genes sintetizados foi digerido com Not I.

Fragmentos de restrição de Not I com os genes DGAT foram ligados a DNA desfosforilado linearizado de KS332, que é descrito no Exemplo 5. As construções de DNA resultantes nas quais a expressão de variantes otimizadas por expressão de genes DGAT1 de *Yarrowia* ou DGAT2 de *Yarrowia* encontra-se sob o controle do promotor de betaconglucininina são indicadas, portanto, como KS392 e KS393. A sua sequência é definida como SEQ ID Nº 101 e SEQ ID Nº 102. Além disso, foi construído o plasmídeo KS391. Com este propósito, o DNA de KS349 foi digerido com NotI e NcoI. As extremidades do fragmento de DGAT1 resultante foram completamente preenchidas, ligadas a NotI linearizado e preenchidas em DA de KS332. A construção de plasmídeo resultante é denominada, portanto, KS391. Nesta construção, as sequências de YL DGAT1 nativas encontram-se sob o controle do promotor de betaconglucininina. A sequência de KS391 é definida como SEQ ID Nº 103. Embriões somáticos de soja transgênica foram regenerados após o bombardeamento de partículas com DNA de plasmídeo de KS391, KS392, KS362 e KS393, conforme descrito acima (Exemplo 5). O teor de óleo de embriões somáticos foi medido utilizando NMR. Tecido de embrião rapidamente liofilizado foi pulverizado na ampola do genomoedor conforme descrito anteriormente (Exemplo 4). 20 a 200 mg de pó de tecido foram transferidos para tubos NMR. O teor de óleo do pó de tecido de embrião somático foi calculado a partir do sinal NMR conforme descrito no Exemplo 4.

TABELA 33

TEOR DE ÓLEO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA TRANSFORMADOS COM PKS392 E

pKS391

	ID	Construção	% óleo
1	2196.1.08	KS392	15,7
2	2196.3.03	KS392	13,9

	ID	Construção	% óleo
3	2196.1.05	KS392	13,7
4	2196.1.15	KS392	13,4
5	2196.1.02	KS392	12,2
6	2196.3.07	KS392	12,1
7	2196.3.04	KS392	12,1
8	2196.3.05	KS392	11,6
9	2196.3.05	KS392	11,4
10	2196.1.07	KS392	11,4
11	2196.1.03	KS392	10,4
12	2196.1.14	KS392	10,2
13	2196.1.12	KS392	9,4
14	2196.3.08	KS392	9,1
15	2196.3.09	KS392	8,1
16	2196.4.02	KS392	8,1
17	2196.1.09	KS392	7,8
18	2196.2.01	KS392	7,6
19	2196.5.01	KS392	7,4
20	2196.3.01	KS392	7,4
21	2196.1.04	KS392	7,3
22	2196.2.02	KS392	7,3
23	2196.3.02	KS392	6,9
24	2196.1.10	KS392	6,5
25	2196.4.03	KS392	6,5
26	2196.1.11	KS392	6,0
27	2196.4.01	KS392	5,7
28	2196.3.06	KS392	5,4

	ID	Construção	% óleo
29	2196.5.02	KS392	5,3
30	2196.1.13	KS392	3,5
		% média de óleo	9,1
1	2195.3.15	KS391	12,8
2	2195.5.02	KS391	11,5
3	2195.3.01	KS391	11,2
4	2195.3.03	KS391	11,0
5	2195.3.02	KS391	10,6
6	2195.4.06	KS391	10,4
7	2195.3.08	KS391	10,2
8	2195.2.01	KS391	10,1
9	2195.3.04	KS391	9,3
10	2195.3.05	KS391	9,2
11	2195.5.01	KS391	9,1
12	2195.2.04	KS391	8,8
13	2195.3.14	KS391	8,6
14	2195.3.10	KS391	7,8
15	2195.4.01	KS391	7,7
16	2195.5.03	KS391	6,5
17	2195.4.02	KS391	6,4
18	2195.3.09	KS391	6,3
19	2195.4.07	KS391	6,2
20	2195.3.06	KS391	6,1
21	2195.3.13	KS391	6,0
22	2195.5.05	KS391	5,9
23	2195.4.03	KS391	5,6

	ID	Construção	% óleo
24	2195.5.04	KS391	5,5
25	2196.1.01	KS391	5,3
26	2195.4.04	KS391	5,3
27	2195.3.11	KS391	5,2
28	2195.2.03	KS391	5,0
29	2195.4.05	KS391	4,9
30	2195.3.07	KS391	4,4
31	2195.2.02	KS391	4,3
		% média de óleo	7,6

[0436] A Tabela 33 compara o teor de óleo de 30 e 31 eventos gerados com KS 392 e KS391, respectivamente.

[0437] O teor médio de óleo de todos os eventos gerados com KS392 foi de 9,1%, enquanto o teor de óleo de todos os eventos gerados com KS391 foi de 7,6%.

[0438] Além disso, o teor de óleo mais alto observado com KS392 foi de 15,7%, quando comparado com 12,8% para KS391. Os depositantes demonstraram que a otimização da expressão de YL DGAT1 gera aumento do teor de óleo em embriões de soja em desenvolvimento quando comparado com o gene YL DGAT1 nativo.

TABELA 34

TEOR DE ÓLEO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA TRANSFORMADOS COM PKS393 E PKS362

	ID	Construção	% óleo
1	2207.5.05	KS393	12,3
2	2207.5.08	KS393	12,2
3	2207.5.06	KS393	11,7

	ID	Construção	% óleo
4	2207.5.03	KS393	10,8
5	2207.5.01	KS393	10,6
6	2207.5.04	KS393	10,3
7	2207.4.04	KS393	10,3
8	2207.3.08	KS393	9,5
9	2207.5.07	KS393	9,3
10	2207.4.01	KS393	8,8
11	2207.4.02	KS393	8,7
12	2207.3.06	KS393	8,0
13	2207.3.04	KS393	7,9
14	2207.4.06	KS393	7,8
15	2207.4.03	KS393	7,7
16	2207.4.08	KS393	7,4
17	2207.3.14	KS393	7,1
18	2207.4.05	KS393	7,0
19	2207.3.12	KS393	7,0
20	2207.3.01	KS393	6,9
21	2207.5.02	KS393	6,8
22	2207.3.02	KS393	6,7
23	2207.3.07	KS393	6,7
24	2207.3.03	KS393	6,6
25	2207.3.13	KS393	6,5
26	2207.3.11	KS393	6,3
27	2207.3.05	KS393	5,8
28	2207.3.10	KS393	5,8
29	2207.4.07	KS393	5,5

	ID	Construção	% óleo
30	2207.3.08	KS393	5,4
31	2207.4.09	KS393	5,4
		% média de óleo	8,0
1	2208.2.08	KS362	11,6
2	2208.5.04	KS362	11,5
3	2208.2.04	KS362	11,5
4	2208.2.10	KS362	11,2
5	2208.2.09	KS362	10,3
6	2208.2.02	KS362	10,2
7	2208.5.02	KS362	10,0
8	2208.3.10	KS362	9,8
9	2208.3.12	KS362	9,8
10	2208.3.06	KS362	9,5
11	2208.3.04	KS362	8,8
12	2208.3.05	KS362	8,6
13	2208.2.07	KS362	8,1
14	2208.2.03	KS362	8,0
15	2208.3.03	KS362	8,0
16	2208.5.01	KS362	8,0
17	2208.2.06	KS362	7,8
18	2208.2.11	KS362	7,4
19	2208.5.07	KS362	7,3
20	2208.3.14	KS362	7,2
21	2208.3.02	KS362	7,0
22	2208.3.08	KS362	6,4
23	2208.3.07	KS362	6,1

	ID	Construção	% óleo
24	2208.2.12	KS362	6,1
25	2208.3.09	KS362	6,0
26	2208.3.11	KS362	6,0
27	2208.2.01	KS362	5,8
28	2208.2.05	KS362	5,7
29	2208.3.01	KS362	5,4
30	2208.5.03	KS362	5,1
31	2208.3.13	KS362	4,7
32	2208.5.06	KS362	4,1
33	2208.3.05	KS362	3,2
		% média de óleo	7,8

[0439] A Tabela 34 compara o teor de óleo de 31 e 33 eventos gerados com KS393 e KS362. O teor médio de óleo de todos os eventos gerados com KS393 foi de 8,0%, enquanto o teor de óleo de todos os eventos gerados com KS362 foi de 7,8%. Além disso, o teor de óleo mais alto observado com KS393 foi de 12,3% quando comparado com 11,6% para KS362.

[0440] Os depositantes demonstraram que a otimização da expressão de YL DGAT2 gera um aumento muito pequeno do teor de óleo em embriões de sementes em desenvolvimento, quando comparado com o gene YL DGAT2 nativo.

EXEMPLO 18

COEXPRESSION DE YL DGAT1 COM UMA CONSTRUÇÃO DE REGULAGEM PARA

BAIXO DE FAD2/TE2 EM EMBRIÕES SOMÁTICOS DE SOJA:

[0441] O presente exemplo descreve a construção de vetores de expressão de soja pKR1274, que compreendem DGAT1 de *Yarrowia* (YL

DGAT1) e pKR1267 ou pKR1269, que compreendem uma construção de regulação para baixo de ácido graxo de soja dessaturase 2 (GM FAD2)/tioesterase 2 (GM TE2). Embora as regiões de regulação para baixo de GM FAD2-TE2 de pKR1267 e pKR1269 sejam idênticas em cada construção e ambas sejam dirigidas pelo promotor KTi3, pKR1267 contém apenas o terminal KTi3 e pKR1269 contém os terminais de KTi3 e albumina de soja.

CONSTRUÇÃO DE PKR1274 QUE COMPREENDE YL DGAT1:

[0442] Um plasmídeo inicial pKR85 (SEQ ID Nº 27) que foi descrito anteriormente no Exemplo 4 contém o gene fosfotransferase de higromicina B (HPT) (Gritz, L. e Davies, J., *Gene* 25: 179-188 (1983)), ladeado pelo promotor T7 e término de transcrição (conjunto T7prom/hpt/T7term) e uma origem de reprodução bacteriana (ori) para seleção e reprodução em bactérias (tais como *E. coli*). Além disso, pKR72 também contém o gene fosfotransferase de higromicina B, ladeado pelo promotor 35S (Odell *et al.*, *Nature* 313: 810-812 (1985)) e término de transcrição NOS 3' (Depicker *et al.*, *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 561-570 (1982)) (conjunto 35S/hpt/NOS3') para seleção em plantas tais como soja. O plasmídeo pKR85 (SEQ ID Nº 27) também contém um local de restrição de *NotI*, ladeado pelo promotor para a subunidade α' de β -conglícinina (Beachy *et al.*, *EMBO J.* 4: 3047-3053 (1985)) e a região de término de transcrição 3' do gene de faseolina (Doyle *et al.*, *J. Biol. Chem.* 261: 9228-9238 (1986)), denominada conjunto Bcon/*NotI*/Phas3'.

[0443] O conjunto Bcon/*NotI*/Phas3' foi removido de pKR85 (SEQ ID Nº 27) por meio de digestão com *HindIII* e o fragmento resultante foi novamente ligado para produzir pKR278 (SEQ ID Nº 104).

[0444] O fragmento BsiWI de pKR1235 (SEQ ID Nº 74, Exemplo 14), que contém o YL DGAT1, foi clonado no local BsiWI de pKR278 (SEQ ID Nº 104), que foi descrito anteriormente em BB1574; publicado em US20080095915 (cujo conteúdo é incorporado como referência), para produzir

pKR1274 (SEQ ID N° 105).

**CONSTRUÇÃO DE PKR1267 QUE COMPREENDE CONJUNTO DE REGULAGEM PARA
BAIXO GM FAD2-TE2:**

[0445] A extremidade 5' de GM TE2 (SEQ ID N° 106) foi amplificada a partir de pTC4 (SEQ ID N° 107), que foi descrita anteriormente em WO 1996006936A1 (cujo conteúdo é incorporado como referência) com os primers de oligonucleotídeos GmTE2_5-1 (SEQ ID N° 108) e GmTE2_3-1 (SEQ ID N° 109), utilizando a DNA polimerase de alta fidelidade Phusion® (Cat. n° F553S, Finnzymes Oy, Finlândia) seguindo o protocolo do fabricante. A extremidade 3' de GM TE2 (SEQ ID N° 106) foi amplificada a partir de pTC4 (SEQ ID N° 107) com os primers de oligonucleotídeos GmTE2_5-2 (SEQ ID N° 110) e GmTE2_3-2 (SEQ ID N° 111), utilizando a DNA polimerase de alta fidelidade Phusion® (Cat. n° F553S, Finnzymes Oy, Finlândia) seguindo o protocolo do fabricante. Os dois produtos de PCR resultantes foram combinados e amplificados com GmTE2_5-1 (SEQ ID N° 108) e GmTE2_3-2 (SEQ ID N° 111), utilizando a DNA polimerase de alta fidelidade Phusion® (Cat. n° F553S, Finnzymes Oy, Finlândia), seguindo o protocolo do fabricante.

[0446] O fragmento de DNA resultante foi clonado no vetor de clonagem pCR-Blunt® utilizando o Kit de Clonagem PCR Zero Blunt® (Invitrogen Corporation), seguindo o protocolo do fabricante, para produzir pKR1258 (SEQ ID N° 112).

[0447] A extremidade 5' de GM FAD2 (SEQ ID N° 113) foi amplificada a partir de pBS43 (SEQ ID N° 114), que foi descrito anteriormente em WO 1197047731A2 (cujo conteúdo é incorporado como referência), com primers de oligonucleotídeos GmFAD2-1_5-1 (SEQ ID N° 115) e GmFAD2-1_3-1 (SEQ ID N° 116), utilizando a DNA polimerase de alta fidelidade Phusion® (Cat. n° F553S, Finnzymes Oy, Finlândia), seguindo o protocolo do fabricante.

[0448] A extremidade 3' de GM FAD2-1 (SEQ ID N° 113) foi

amplificada a partir de pBS43 (SEQ ID Nº 114) com os primers de oligonucleotídeos GmFAD2-1_5-2 (SEQ ID Nº 117) e GmFAD2-1_3-2 (SEQ ID Nº 118), utilizando a DNA polimerase de alta fidelidade Phusion® (Cat. nº F553S, Finnzymes Oy, Finlândia) seguindo o protocolo do fabricante.

[0449] O fragmento de DNA resultante foi clonado no vetor de clonagem pCR-Blunt® utilizando o Kit de Clonagem de PCR Zero Blunt® (Invitrogen Corporation), seguindo o protocolo do fabricante, para produzir PCRblunt-Fad-2-1 (SEQ ID Nº 119).

[0450] O fragmento MluI de pKR1258 (SEQ ID Nº 112), que contém GM TE2, foi clonado no fragmento MluI de pCRblunt-Fad2-1 (SEQ ID Nº 119), que contém GM FAD2-1, para produzir pKR1259 (SEQ ID Nº 120).

[0451] O fragmento EcoRI de pKR1259 (SEQ ID Nº 120) compreendeu a extremidade 5' do fragmento GM FAD2/TE2, foi clonado no local MfeI de pKR1259 (SEQ ID Nº 122) para produzir pKR1261 (SEQ ID Nº 121) e forma uma estrutura de grampo de cabelo GM FAD2-TE2-TE2loop-TE2-FAD2 ladeada por locais NotI.

[0452] O fragmento NotI de pKR1261 (SEQ ID Nº 121), que contém GM FAD2-TE2-TE2loop-TE2-FAD2, foi clonado no local NotI de pKR123R (SEQ ID Nº 122), que foi descrito anteriormente em WO 2004071467A2 (cujo conteúdo é incorporado como referência), para produzir pKR1266 (SEQ ID Nº 123).

[0453] O fragmento BsiWI/PstI de pKR1266 (SEQ ID Nº 123), que contém o GM FAD2-TE2-TE2loop-TE2-FAD2, foi clonado no fragmento BsiWI/SbfI de pKR278 (SEQ ID Nº 104), para produzir pKR1267 (SEQ ID Nº 124).

CONSTRUÇÃO DE PKR1269 QUE COMPREENDE O CONJUNTO DE REGULAGEM PARA

BAIXO DE GM FAD2-TE2:

[0454] O fragmento de NotI de pKR1261 (SEQ ID Nº 121), que

contém GM FAD2-TE2-TE2loop-TE2-FAD2, foi clonado no local NotI de pKR457 (SEQ ID Nº 125), que foi descrito anteriormente no documento WO 2005/047479 (cujo conteúdo é incorporado ao presente como referência), para produzir pKR1264 (SEQ ID Nº 126).

[0455] O fragmento PstI de pKR1264 (SEQ ID Nº 126), que contém o GM FAD2-TE2-TE2loop-TE2-FAD2 foi clonado no subfragmento SbfI de pKR277 (SEQ ID Nº 127), que foi descrito anteriormente no documento WO 2004/071467 para produzir pKR1269 (SEQ ID Nº 128).

[0456] Coexpressão de construções de regulação para baixo de GM FAD2-TE2-TE2loop-TE2-FAD2 isoladamente ou com YL DGAT2:

[0457] Cultivo de suspensão embriogênica de soja (cv. Jack) foi transformado com o pKR 1267 (SEQ ID Nº 124) isoladamente e que possui o número de experimento MSE2213 ou com o fragmento de BsiWI de pKR1269 (SEQ ID Nº 128) e pKR1274 (SEQ ID Nº 105) e que possui número de experimento MSE2210. Os eventos foram selecionados e embriões somáticos amadurecidos em SHaM conforme descrito no Exemplo 5.

[0458] Concentrações de óleo e perfis de ácidos graxos foram determinados conforme descrito no Exemplo 4 de MSE2213 e MSE2210 e os resultados de cada experimento são exibidos na Tabela 35 e na Tabela 36, respectivamente.

TABELA 35

CONCENTRAÇÕES DE ÓLEO E PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS PARA EVENTOS DE MSE2213

MSE2213 (GM FAD2-TE2-TE2loop-TE2-FAD2)						
Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	% óleo
2213-16	5,8	2,6	72,7	10,5	8,5	16,8
2213-26	12,0	5,7	24,8	47,2	10,4	16,5

MSE2213 (GM FAD2-TE2-TE2loop-TE2-FAD2)						
Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	% óleo
2213-30	11,7	5,3	18,5	53,1	11,4	15,4
2213-23	9,0	3,2	52,2	24,7	11,0	15,3
2213-29	13,1	3,7	13,3	57,1	12,8	15,0
2213-7	6,4	3,1	66,3	15,6	8,6	14,9
2213-31	11,7	3,0	26,9	46,5	11,9	14,5
2213-13	6,7	3,3	64,5	16,6	8,9	14,4
2213-5	3,5	3,0	78,0	7,5	8,1	13,8
2213-9	7,6	3,4	57,6	20,3	11,0	13,2
2213-20	7,8	4,1	56,7	20,8	10,6	13,1
2213-4	4,1	2,7	72,1	11,1	10,0	12,7
2213-17	7,7	5,2	57,0	19,7	10,4	12,5
2213-3	7,4	3,6	64,4	14,4	10,2	12,5
2213-24	12,9	7,3	29,4	39,0	11,4	12,1
2213-1	13,8	7,1	22,1	44,6	12,4	11,9
2213-6	6,7	2,2	57,2	22,2	11,7	11,8
2213-11	9,2	5,2	58,2	16,4	11,0	10,9
2213-2	7,8	4,3	45,3	31,0	11,7	10,6
2213-14	7,3	4,6	63,0	15,0	10,2	10,5
2213-27	8,5	6,0	48,9	25,0	11,6	10,1
2213-19	8,0	4,0	53,7	21,4	12,8	9,9
2213-21	11,1	5,6	28,3	40,6	14,4	9,8
2213-18	7,4	4,1	57,2	17,7	13,5	9,4
2213-12	6,4	4,3	63,2	15,5	10,6	9,4
2213-10	13,8	7,0	24,0	42,1	13,2	9,4
2213-28	8,8	4,1	54,1	19,1	13,8	9,1

MSE2213 (GM FAD2-TE2-TE2loop-TE2-FAD2)						
Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	% óleo
2213-25	6,9	3,5	53,9	21,9	13,8	9,0
2213-25	6,9	3,5	53,9	21,9	13,8	9,0
2213-15	5,2	3,4	61,7	17,6	12,1	8,0
2213-8	14,4	6,6	20,0	42,9	16,1	7,6
2213-22	14,3	6,3	21,3	41,9	16,2	7,2
Média	8,9	4,4	47,9	27,1	11,6	11,9

TABELA 36**CONCENTRAÇÕES DE ÓLEO E PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS PARA EVENTOS DE****MSE2210**

MSE2210 (YL DGAT1 e GM FAD2-TE2-TE2loop-TE2-TE2-FAD2)						
Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	% óleo
2210-2	3,8	2,7	74,7	13,1	5,8	22,1
2210-23	10,3	6,8	32,0	44,4	6,5	20,0
2210-29	7,5	5,5	63,9	17,1	6,0	20,0
2210-19	3,9	3,5	79,1	8,1	5,4	19,7
2210-10	7,3	3,8	66,6	15,6	6,7	19,6
2210-12	5,7	3,6	67,6	17,6	5,6	19,6
2210-14	4,5	2,4	67,9	17,8	7,4	19,3
2210-25	5,1	3,5	71,8	13,1	6,4	18,4
2210-5	9,0	4,1	43,1	35,9	7,9	17,8
2210-24	13,7	4,3	20,5	52,5	9,1	17,5
2210-13	10,2	5,5	36,8	40,4	7,0	17,4
2210-11	10,9	7,8	30,6	43,2	7,5	16,6
2210-1	4,1	3,0	75,6	9,6	7,7	15,9
2210-6	2,7	1,7	83,9	5,3	6,4	15,5

MSE2210 (YL DGAT1 e GM FAD2-TE2-TE2loop-TE2-TE2-FAD2)						
Evento	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	% óleo
2210-16	8,4	3,7	48,5	31,3	8,1	15,3
2210-26	7,1	4,9	55,2	24,7	8,1	14,4
2210-7	4,3	3,2	62,9	20,8	8,7	14,3
2210-20	6,8	4,3	65,2	15,7	7,9	13,8
2210-27	10,9	7,4	42,4	30,0	9,3	13,8
2210-30	5,0	2,4	65,1	17,1	10,4	13,7
2210-3	7,1	4,8	52,9	27,4	7,9	13,6
2210-4	6,0	3,7	66,0	15,9	8,5	13,3
2210-22	3,2	3,3	77,7	8,1	7,8	13,2
2210-8	9,1	4,9	49,7	27,3	9,0	13,1
2210-21	6,0	3,5	67,8	14,9	7,8	12,8
2210-18	12,7	5,2	20,2	49,7	12,1	12,5
2210-31	4,4	2,9	73,1	10,1	9,5	11,7
2210-9	4,0	3,1	74,1	9,3	9,6	11,2
2210-15	3,5	2,4	72,5	11,0	10,6	11,1
2210-28	14,1	5,7	20,2	45,5	14,5	10,1
2217-29	12,0	7,5	28,0	38,8	13,8	8,7
Média	7,2	4,2	56,6	23,6	8,4	15,4

[0459] A comparação dos resultados nas Tabelas 35 e 36 demonstra que a combinação da expressão de YL DGAT1 com a regulação para baixo de GM FAD2-1 e GM TE2 altera o perfil de ácidos graxos até um ponto que excede a alteração observada quando apenas genes FAD2-1 e TE2 são suprimidos.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA AUMENTAR O TEOR DE ÁCIDO GRAXO TOTAL DE UMA SEMENTE DE SOJA, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) transformação de pelo menos uma célula de soja com uma construção recombinante que contém pelo menos uma sequência de DGAT conforme definida em SEQ ID NO: 9, 66, 82, 87 ou 92; e

(b) seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) contendo um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% quando comparado com o teor de ácido graxo total de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a porcentagem de ácidos graxos na dita semente de soja, que é representado pelo ácido linolênico, é diminuída.

3. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende as etapas de:

(a) regeneração de uma planta transgênica a partir da(s) dita(s) célula(s) de soja transformada(s); e

(b) obtenção de uma semente de soja transgênica a partir da dita planta transgênica, em que a dita semente de soja transgênica compreende a dita construção recombinante, e em que a dita semente de soja transgênica possui um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% quando comparado com o teor de ácido graxo total de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

4. MÉTODO PARA AUMENTAR O TEOR DE ÁCIDO GRAXO TOTAL DE UMA SEMENTE DE MILHO, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) transformação de pelo menos uma semente de milho com

uma construção recombinante que possui pelo menos uma sequência de DGAT conforme definida em SEQ ID NO: 9, 66, 82, 87 ou 92; e

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

5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a porcentagem de ácidos graxos na dita semente de milho, que são representados pelo ácido linolênico, é diminuída.

6. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 5, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende as etapas de:

(a) regeneração de uma planta transgênica a partir da(s) dita(s) semente(s) de milho transformada(s); e

(b) obtenção de uma semente de milho transgênica a partir da dita planta transgênica, em que a dita semente de milho transgênica compreende a dita construção recombinante, e em que a dita semente de milho transgênica possui um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% quando comparado com o teor de ácido graxo total de uma semente de milho segregante nula não transgênica.

7. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) compreende a seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% e um teor de ácido oleico aumentado de pelo menos 25% quando comparado com o teor de ácido graxo total e com o teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende as etapas de:

(a) regeneração de uma planta transgênica a partir da(s) dita(s) célula(s) de soja transformada(s); e

(b) obtenção de uma semente de soja transgênica a partir da dita planta transgênica, em que a dita semente de soja transgênica compreende a dita construção recombinante, e em que a dita semente de soja transgênica possui um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% e um teor de ácido oleico aumentado de pelo menos 25% quando comparado com o teor de ácido graxo total e com o teor de ácido oleico de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

9. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) compreende a seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% e um teor de ácido linolênico diminuído de pelo menos 25% quando comparado com o teor de ácido graxo total e com o teor de ácido linolênico de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende as etapas de:

(a) regeneração de uma planta transgênica a partir da(s) dita(s) célula(s) de soja transformada(s); e

(b) obtenção de uma semente de soja transgênica a partir da dita planta transgênica, em que a dita semente de soja transgênica compreende a dita construção recombinante, e em que a dita semente de soja transgênica possui um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% e um teor de ácido linolênico diminuído de pelo menos 25% quando comparado com o teor de ácido graxo total e com teor de ácido linolênico de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

11. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações

1 a 2, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) compreende a seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% e um teor de ácido linolênico diminuído de pelo menos 4% quando comparado com o teor de ácido graxo total e com o teor de ácido linolênico de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que ainda compreende as etapas de:

(a) regeneração de uma planta transgênica a partir da(s) dita(s) célula(s) de soja transformada(s); e

(b) obtenção de uma semente de soja transgênica a partir da dita planta transgênica, em que a dita semente de soja transgênica compreende a dita construção recombinante, e em que a dita semente de soja transgênica possui um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% e um teor de ácido linolênico diminuído de pelo menos 4% quando comparado com o teor de ácido graxo total e com o teor de ácido linolênico de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

13. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) compreende a seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% e um teor de ácido palmítico diminuído de pelo menos 8% quando comparado com o teor de ácido graxo total e com o teor de ácido palmítico de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende as etapas de:

(a) regeneração de uma planta transgênica a partir da(s) dita(s) célula(s) de soja transformada(s); e

(b) obtenção de uma semente de soja transgênica a partir da dita planta transgênica, em que a dita semente de soja transgênica compreende a dita construção recombinante e em que a dita semente de soja transgênica possui um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% e um teor de ácido palmítico diminuído de pelo menos 8% quando comparado com o teor de ácido graxo total e com o teor de ácido palmítico de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

15. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) compreende a seleção da(s) célula(s) de soja transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% e um teor de ácido esteárico aumentado de pelo menos 14% quando comparado com o teor de ácido graxo total e com o teor de ácido esteárico de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

16. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende as etapas de:

(a) regeneração de uma planta transgênica a partir da(s) dita(s) célula(s) de soja transformada(s); e

(b) obtenção de uma semente de soja transgênica a partir da dita planta transgênica, em que a dita semente de soja transgênica compreende a dita construção recombinante, e em que a dita semente de soja transgênica possui um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% e um teor de ácido esteárico aumentado de pelo menos 14% quando comparado com o teor de ácido graxo total e com o teor de ácido esteárico de uma semente de soja segregante nula não transgênica.

17. POLINUCLEOTÍDEO RECOMBINANTE, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) uma sequência de nucleotídeos conforme definida em SEQ

ID NO: 82, 87 ou 92; ou

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

18. CONSTRUÇÃO DE DNA RECOMBINANTE, caracterizada pelo fato de que compreende o polinucleotídeo recombinante, conforme definido na reivindicação 17, ligado operacionalmente a pelo menos uma sequência reguladora.

19. MÉTODO PARA AUMENTAR O TEOR TOTAL DE ÁCIDO GRAXO DE UMA SEMENTE DE PLANTA DE SEMENTE OLEAGINOSA, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) transformação de pelo menos uma célula de planta de semente oleaginosa com o polinucleotídeo recombinante, conforme definido na reivindicação 17; e

(b) seleção da(s) célula(s) de planta(s) de semente oleaginosa transformada(s) da etapa (a) que contém(êm) um teor de ácido graxo total aumentado quando comparado com o teor de ácido graxo total de uma semente oleaginosa segregante nula não transgênica.

20. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende a etapa de obtenção de uma célula de planta de semente oleaginosa transformada, em que a dita célula de planta de semente oleaginosa transformada compreende em seu genoma o polinucleotídeo recombinante, conforme definido na reivindicação 17.

21. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende as etapas de:

(a) regeneração de uma planta de semente oleaginosa transgênica a partir da(s) dita(s) célula(s) de planta de semente oleaginosa transformada(s); e

(b) obtenção de uma semente de planta de semente oleaginosa transgênica a partir da dita planta de semente oleaginosa transgênica, em que a dita semente de planta de semente oleaginosa transgênica compreende o dito polinucleotídeo recombinante, conforme definido na reivindicação 17.

22. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 21, caracterizado pelo fato de que a dita semente de planta de semente oleaginosa é selecionada a partir do grupo que consiste em soja, milho, canola, girassol, linho, algodão e açafrão.

23. MÉTODO PARA PRODUZIR UMA SEMENTE DE SOJA OU DE MILHO, possuindo um aumento no teor de ácido graxo total, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) fornecimento de uma semente de soja transgênica ou de uma semente de milho transgênica, em que a dita semente de soja transgênica ou a dita semente de milho transgênica compreende uma construção recombinante que tem pelo menos uma sequência de DGAT conforme definida em SEQ ID NO: 9, 66, 82, 87 ou 92;

(b) cultivo da dita semente de soja transgênica ou da dita semente de milho transgênica para regenerar uma planta de soja transgênica ou uma planta de milho transgênica;

(c) obtenção de uma semente de soja ou de uma semente de milho a partir da dita planta de soja transgênica regenerada ou da dita planta de milho transgênica regenerada, em que a dita semente de soja ou a dita semente de milho possui um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% quando comparado com o teor de ácido graxo total de uma semente de soja segregante nula não transgênica ou uma semente de milho segregante nula não transgênica.

24. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado

pelo fato de que a porcentagem de ácidos graxos na dita semente de soja ou na dita semente de milho, que é representado pelo ácido linolênico, é diminuída.

25. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 24, caracterizado pelo fato de que a dita semente de soja ou a dita semente de milho possui um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% e um teor de ácido oleico aumentado de pelo menos 25% quando comparado com o teor de ácido graxo total e com o teor de ácido oleico de uma semente de soja ou uma semente de milho segregante nula não transgênica.

26. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 24, caracterizado pelo fato de que a dita semente de soja ou a dita semente de milho possui um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% e um teor de ácido linolênico diminuído de pelo menos 25% quando comparado com o teor de ácido graxo total e com o teor de ácido linolênico de uma semente de soja ou uma semente de milho segregante nula não transgênica.

27. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 24, caracterizado pelo fato de que a dita semente de soja ou a dita semente de milho possui um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% e um teor de ácido linolênico diminuído de pelo menos 4% quando comparado com o teor de ácido graxo total e com o teor de ácido linolênico de uma semente de soja ou uma semente de milho segregante nula não transgênica.

28. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 24, caracterizado pelo fato de que a dita semente de soja ou a dita semente de milho possui um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% e um teor de ácido palmítico diminuído de pelo menos 8% quando comparado com o teor de ácido graxo total e com o teor de ácido palmítico de

uma semente de soja ou uma semente de milho segregante nula não transgênica.

29. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 24, caracterizado pelo fato de que a dita semente de soja ou a dita semente de milho possui um teor de ácido graxo total aumentado de pelo menos 10% e um teor de ácido esteárico aumentado de pelo menos 14% quando comparado com o teor de ácido graxo total e com o teor de ácido esteárico de uma semente de soja ou uma semente de milho segregante nula não transgênica.

30. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 29, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende a etapa de usar a dita semente de soja ou a dita semente de milho para produzir um produto e/ou um subproduto.

31. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o dito produto é um alimento ou uma ração.

32. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 31, caracterizado pelo fato de que a dita semente é uma semente de soja.

33. MÉTODO PARA PRODUZIR UM PRODUTO, a partir de uma semente de soja ou de uma semente de milho, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 23 a 29, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

(a) processamento da dita semente de soja ou da dita semente de milho para produzir um produto processado; e

(b) obtenção do produto processado da etapa (a).

34. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende a etapa de produzir alimento ou ração usando o dito produto processado.

Fig.1B

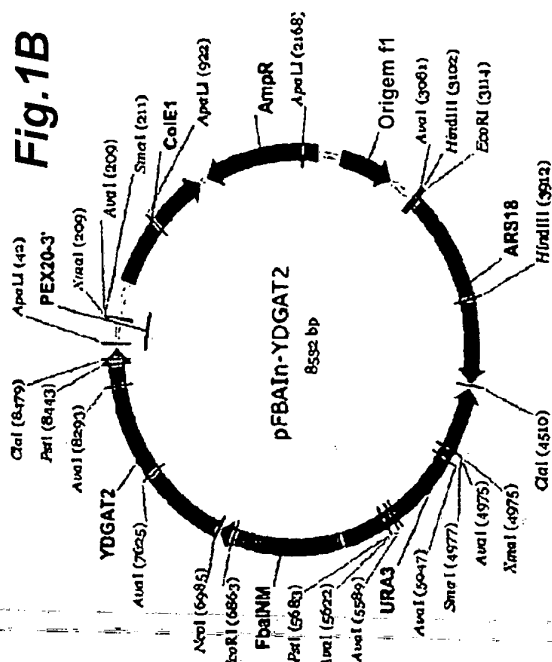


Fig.1C

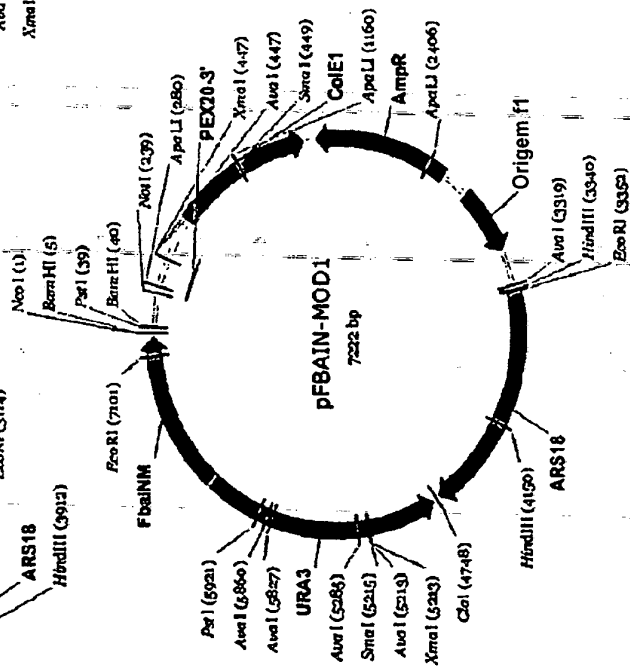
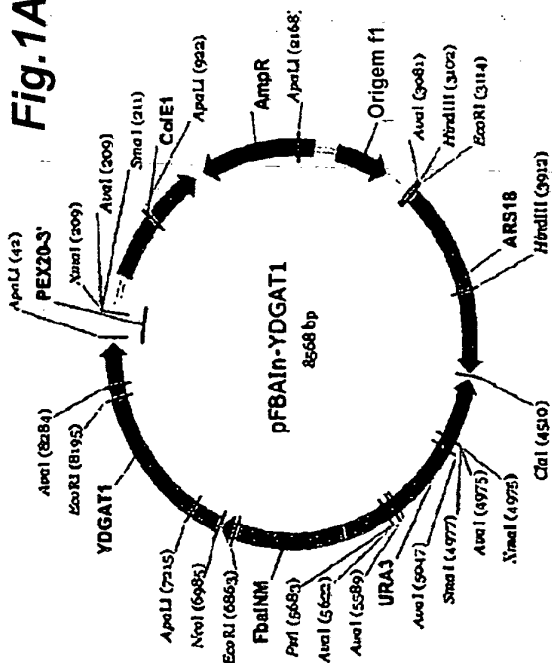
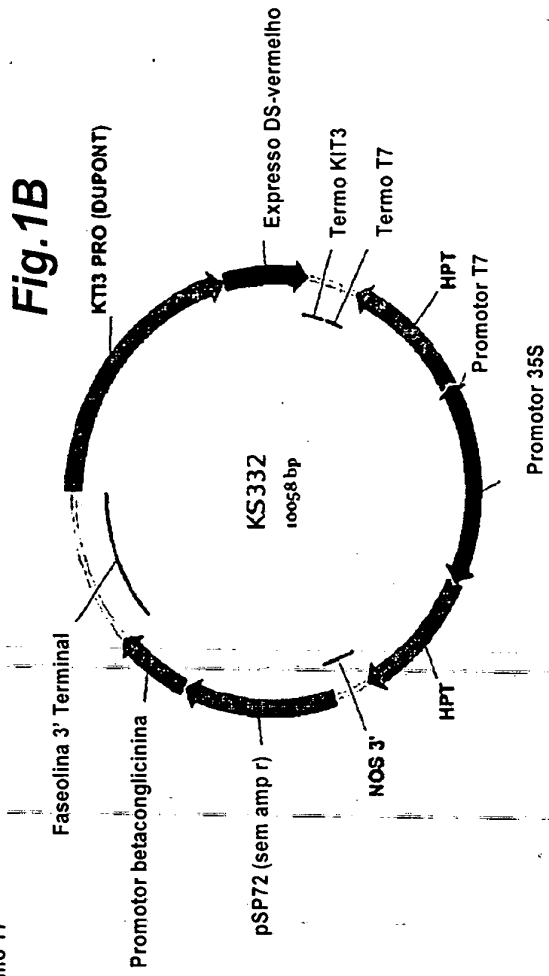
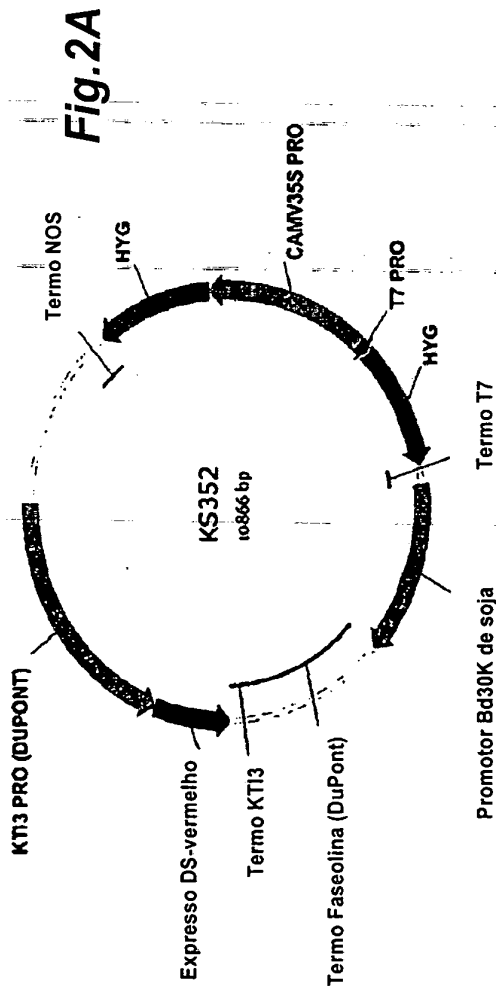


Fig.1A





Promotor Bd30K de soja

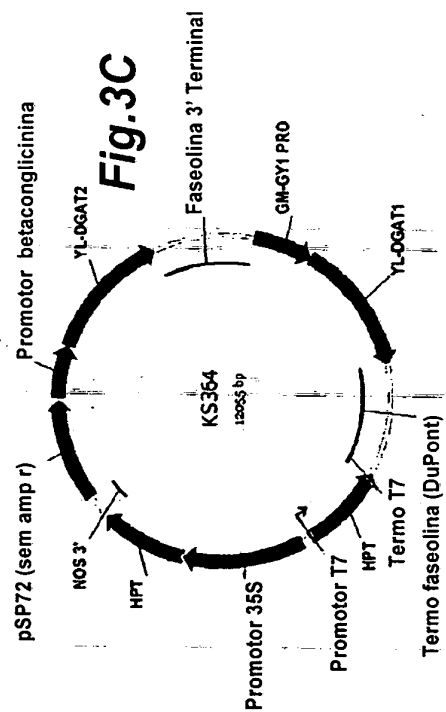
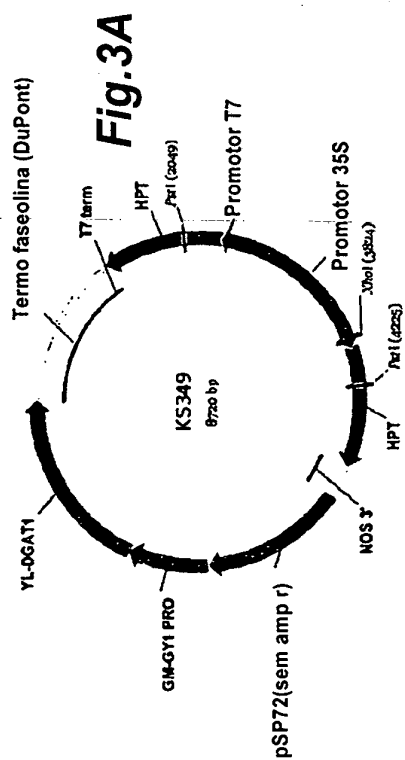
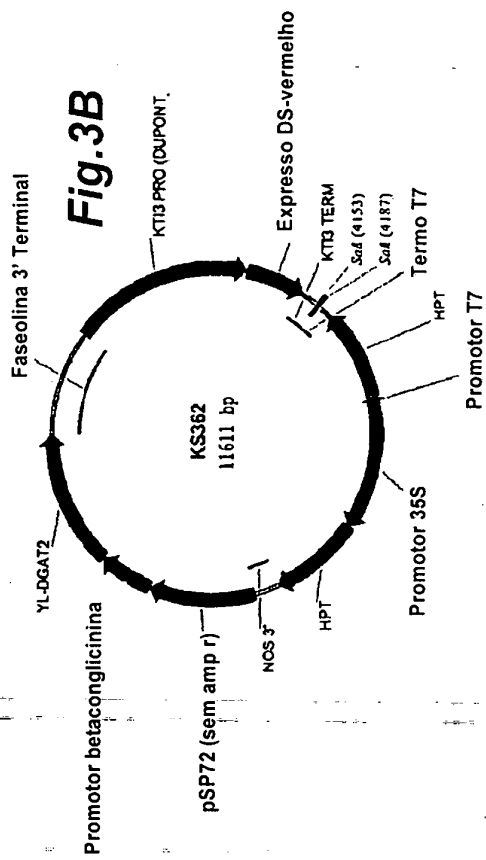


Fig.4A

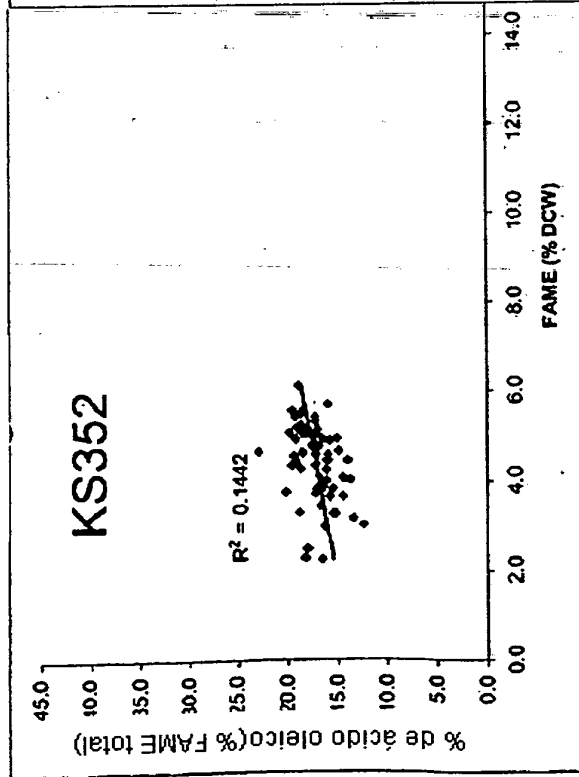
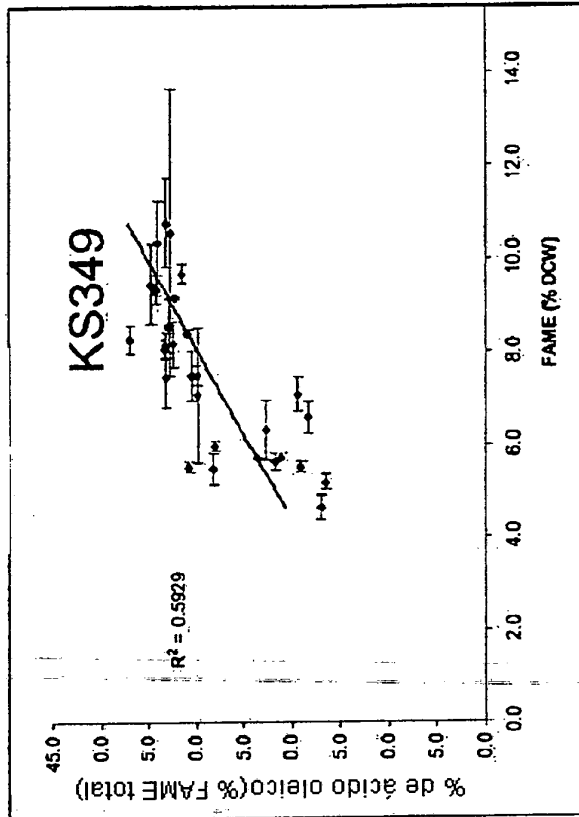


Fig.4B



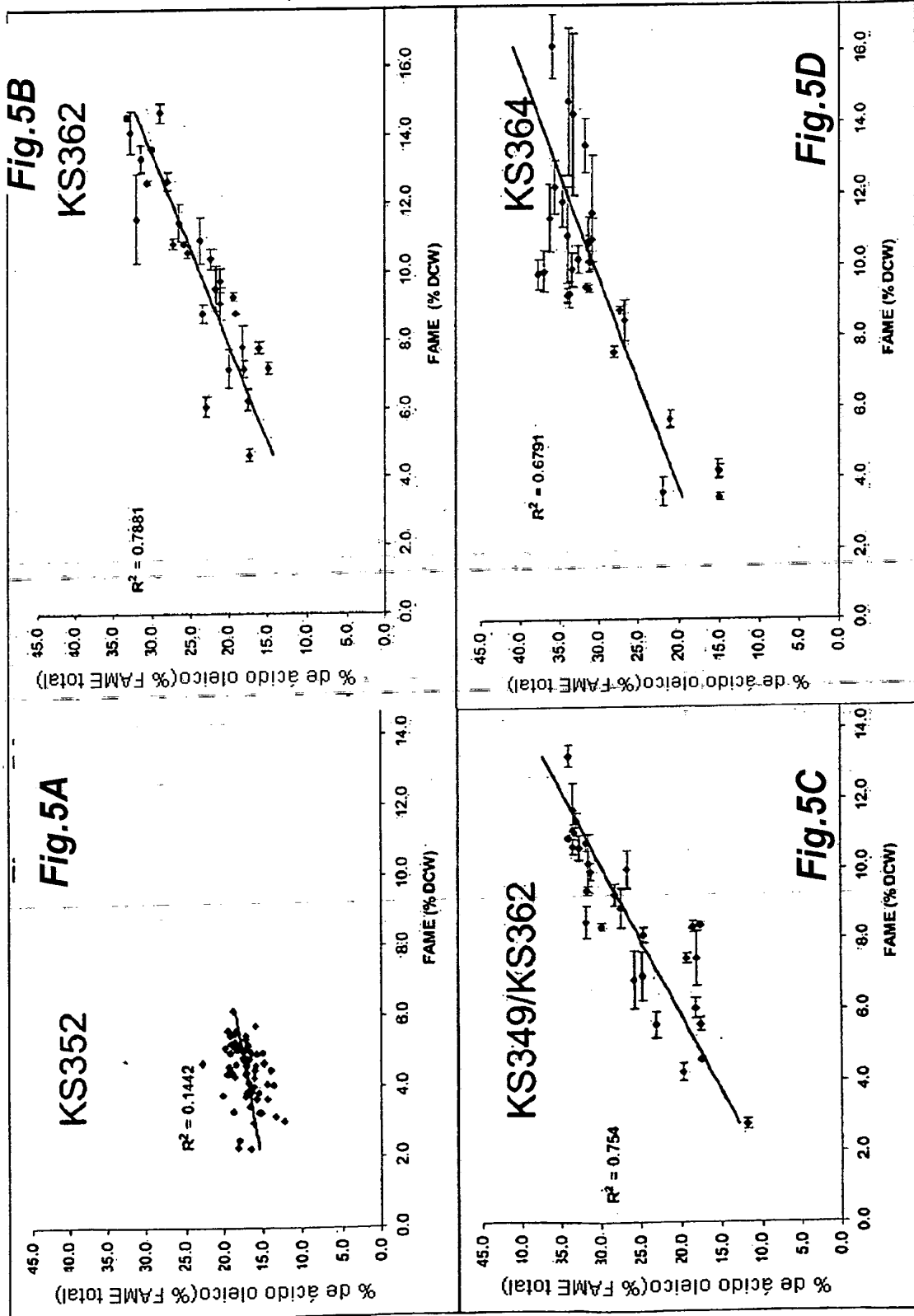


Fig. 6A

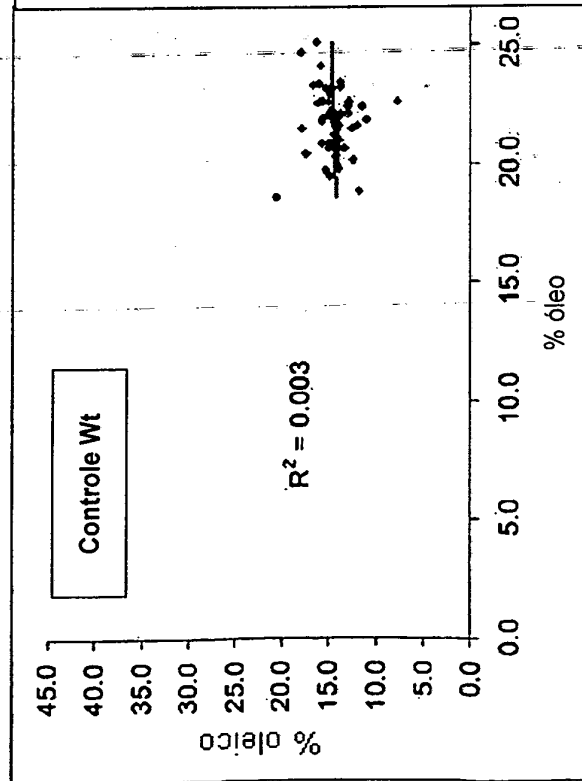
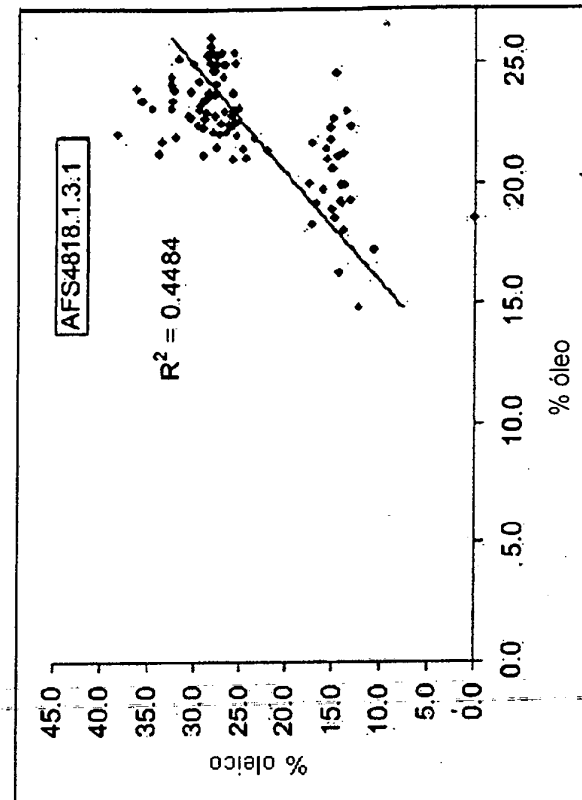


Fig. 6B



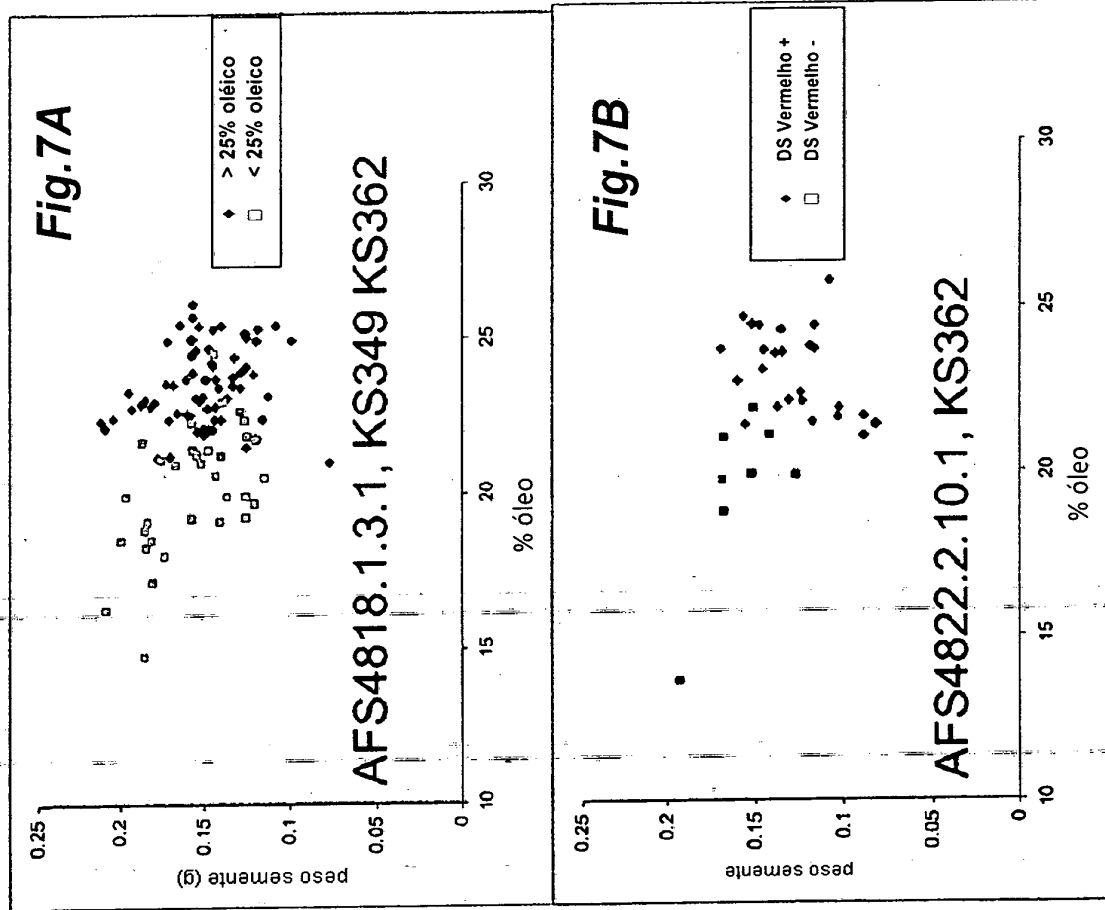
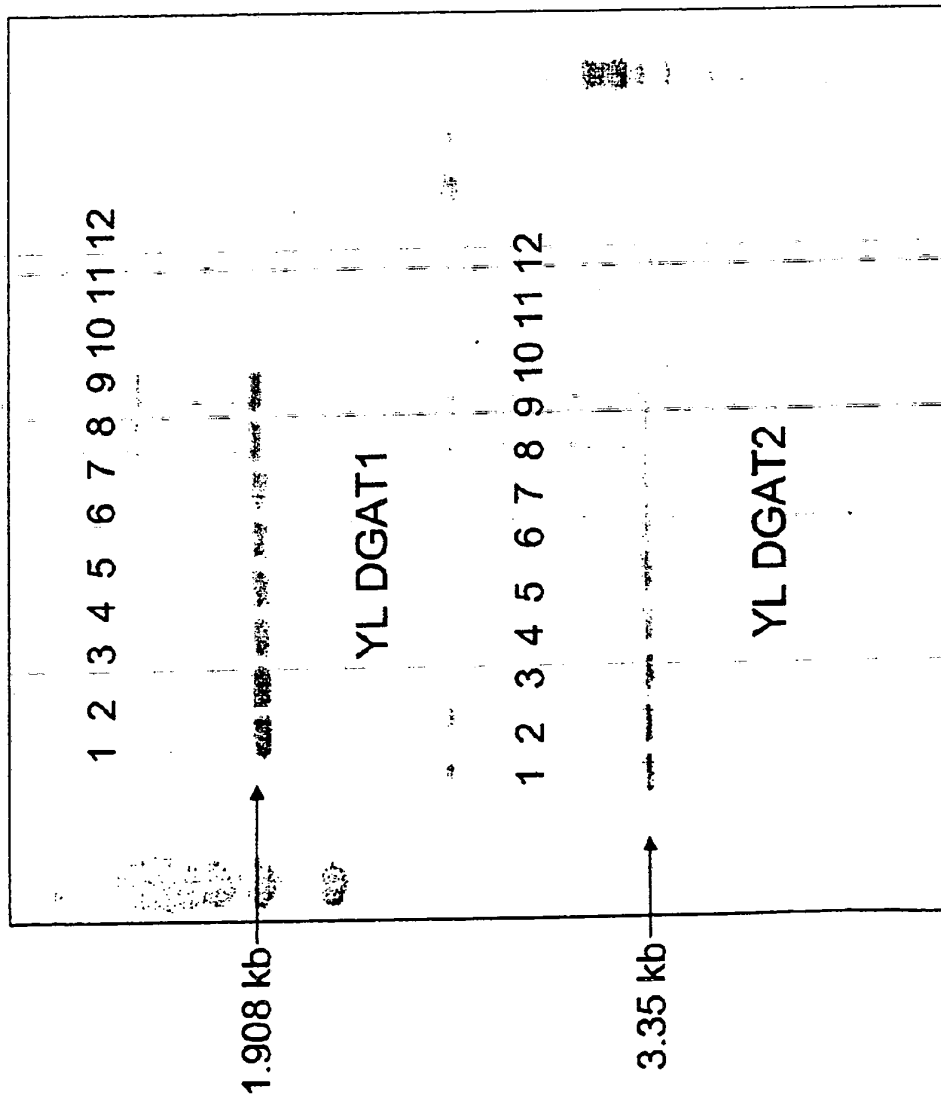


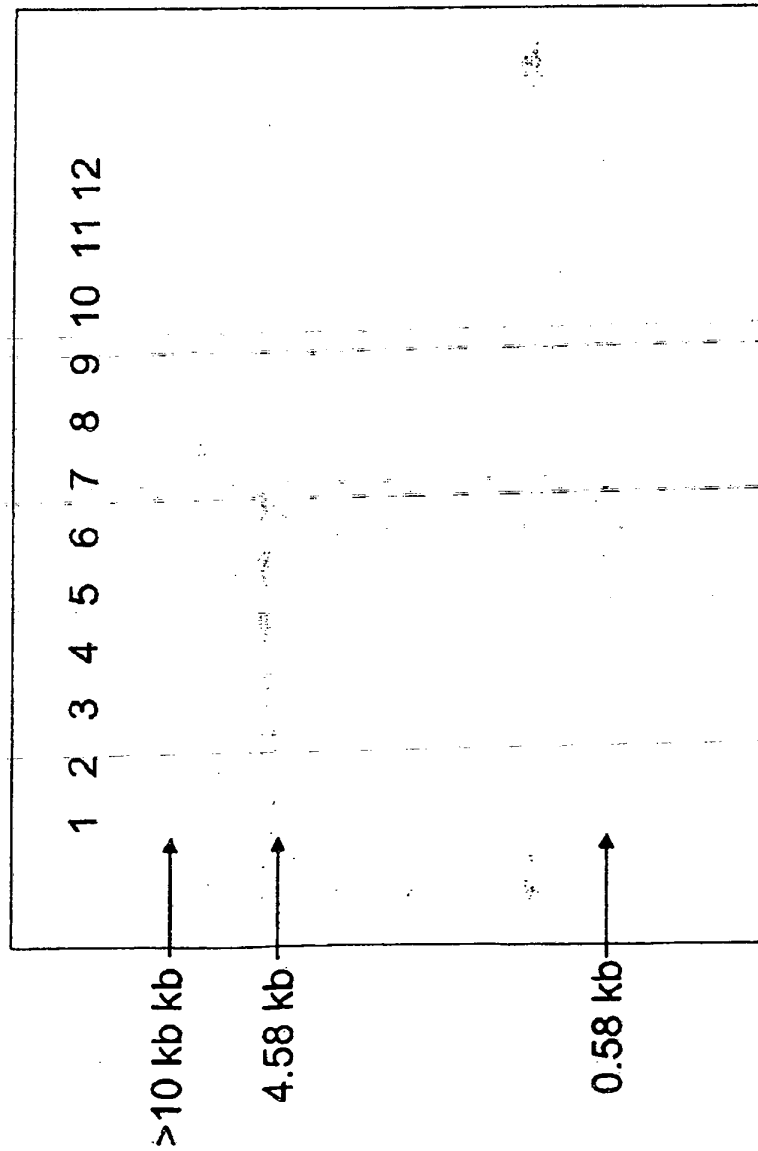
Fig.8A



1:AFS4818.1.2
 2:AFS4818.1.2
 3:AFS4818.1.3
 4:AFS4818.1.3
 5:AFS4818.1.5
 6:AFS4818.1.5
 7:AFS4818.2.6
 8:AFS4818.2.6
 9:AFS4818.1.9
 10:AFS4818.1.9
 11:WT (JACK)
 12:WT (JACK)

Fig.8B

Fig.9



LA: 1kb em escada

1:AFS4818.1.2

2:AFS4818.1.2

3:AFS4818.1.3

4:AFS4818.1.3

5:AFS4818.1.5

6:AFS4818.1.5

7:AFS4818.2.6

8:AFS4818.2.6

9:AFS4818.1.9

10:AFS4818.1.9

11:WT (JACK)

12:WT (JACK)

LB: 100 bp em escada