

(11) Número de Publicação: **PT 2281447 T**

(51) Classificação Internacional:

**A01H 5/00** (2016.01) **C12N 15/11** (2016.01)  
**C12Q 1/68** (2016.01) **G01N 33/53** (2016.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2005.02.16</b>	(73) Titular(es): <b>SYNGENTA PARTICIPATIONS AG</b> <b>SCHWARZWALDALLEE 215 4058 BASEL CH</b>
(30) Prioridade(s): <b>2004.03.25 US 556260 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2011.02.09</b>	(72) Inventor(es): <b>HENRY-YORK STEINER US</b> <b>ERIC CHEN US</b> <b>MOEZ MEGHJI US</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2016.07.27</b> <b>199/2016</b>	(74) Mandatário: <b>MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA</b> <b>RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT</b>

(54) Epígrafe: **EVENTO DE MILHO MIR604**

(57) Resumo:

É DIVULGADO UM NOVO EVENTO DE MILHO TRANSGÊNICO DESIGNADO MIR604. A INVENÇÃO REFERE-SE A SEQUÊNCIAS DE DNA DOS CONSTRUTOS RECOMBINANTES INSERIDOS NO GENOMA DO MILHO E DE SEQUÊNCIAS GENÓMICAS QUE FLANQUEIAM O SÍTIO DE INSERÇÃO QUE RESULTOU NO EVENTO MIR604. A INVENÇÃO DIZ AINDA RESPEITO A ENSAIOS PARA DETETAR A PRESENÇA DAS SEQUÊNCIAS DE DNA DO MIR604, A PLANTAS DE MILHO E A SEMENTES DE MILHO QUE COMPREENDEM O GENÓTIPO MIR604, E A MÉTODOS PARA PRODUIR UMA PLANTA DE MILHO CRUZANDO UMA PLANTA DE MILHO QUE COMPREENDE O GENÓTIPO MIR604 CONSIGO MESMA OU COM UMA OUTRA VARIEDADE DE MILHO.

## **RESUMO**

### **"EVENTO DE MILHO MIR604"**

É divulgado um novo evento de milho transgênico designado MIR604. A invenção refere-se a sequências de DNA dos construtos recombinantes inseridos no genoma do milho e de sequências genômicas que flanqueiam o sítio de inserção que resultou no evento MIR604. A invenção diz ainda respeito a ensaios para detetar a presença das sequências de DNA do MIR604, a plantas de milho e a sementes de milho que compreendem o genótipo MIR604, e a métodos para produzir uma planta de milho cruzando uma planta de milho que compreende o genótipo MIR604 consigo mesma ou com uma outra variedade de milho.

**DESCRIÇÃO**  
**"EVENTO DE MILHO MIR604"**

A presente invenção refere-se em geral à área da biologia molecular das plantas, transformação de plantas, e reprodução de plantas. Mais especificamente, a invenção refere-se a plantas de milho transgênicas resistentes aos insetos que compreendem um novo genótipo transgênico e a métodos de detecção da presença do DNA da planta do milho numa amostra e suas composições.

As pragas vegetais são um fator principal na perda de colheitas agrícolas importantes no mundo. Cerca de 8 mil milhões de dólares são perdidos todos os anos só nos Estados Unidos devido a infestações de pragas de não mamíferos, incluindo insetos. As espécies de lagarta da raiz do milho são consideradas das pragas mais destruidoras do milho. Espécies importantes de pragas de lagartas da raiz incluem a *Diabrotica virgifera virgifera*, a lagarta da raiz do milho ocidental; *D. longicornis barberi*, a lagarta da raiz do milho do norte, *D. undecimpunctata howardi*, a lagarta da raiz do milho do sul, e a *D. virgifera zea*, a lagarta da raiz do milho mexicana.

A lagarta da raiz do milho é sobretudo controlada por aplicações intensivas de pesticidas químicos. Pode ser assim conseguido um bom controlo da lagarta da raiz do milho, mas estes produtos químicos podem por vezes afetar também organismos benéficos. Um outro problema que resulta do amplo uso de pesticidas químicos é o aparecimento de variedades de insetos resistentes. Isto foi aliviado em parte por meio de várias práticas de gestão da resistência,

mas existe uma necessidade crescente de estratégias alternativas para o controlo das pragas. Uma de tais alternativas inclui a expressão de genes exógenos que codificam proteínas inseticidas em plantas transgênicas. Esta aproximação forneceu um meio eficaz de proteção contra pragas selecionadas de insetos, e foram comercializadas plantas transgênicas que expressam toxinas inseticidas, permitindo aos agricultores reduzir as aplicações de inseticidas químicos.

A expressão de genes exógenos em plantas pode ser influenciada pela sua posição nos cromossomas, talvez devido à estrutura da cromatina ou à proximidade de elementos de regulação transcricional perto do sítio de integração (Ver por exemplo, Weising *et al.*, 1988, "Foreign Genes in Plants", *Ann. Rev. Genet.*, 22:421-477). Por conseguinte, é comum produzirem-se centenas de diferentes eventos e triarem-se esses eventos para se encontrar um único evento que possua os níveis e padrões de expressão transgênica desejados para finalidades comerciais. Um evento que possui níveis ou padrões desejados de expressão genética é útil para introgressão do transgene em outros antecedentes genéticos, por fecundação cruzada, usando métodos de reprodução convencionais. A descendência de tais cruzamentos mantém as características de expressão transgênica do transformante original. Esta estratégia é usada para assegurar uma expressão genética fiável num número de variedades que estão bem adaptadas às condições de crescimento locais.

O documento WO 03/018810 divulga sequências de ácido nucleico que codificam as toxinas Cry3A que têm toxicidade aumentada à lagarta da raiz do milho.

O documento WO 2004/011601 divulga composições e métodos para a detecção da presença do DNA do evento de milho MON863 no genoma do milho a partir da transformação do construto recombinante contendo um gene Cry3Bb e de sequências genômicas que flanqueiam o sítio de inserção. São também divulgados plantas com o evento de milho MON863, sua descendência e sementes que contêm o DNA do evento de milho MON863.

WO 02/28185 divulga um método para proteger milho contra danos causados por alimentação de uma ou mais pragas, cujo método inclui o tratamento de sementes de milho que têm um evento transgênico direcionado contra pelo menos uma das pragas e que são capazes de expressar certas proteínas Cry3Bb modificadas, com desde cerca de 100 g até cerca de 400 g de tiametoxam por 100 kg de sementes.

Seria vantajoso ser-se capaz de detetar a presença de um evento particular para se determinar se a descendência de um cruzamento sexual tem um transgene de interesse. Para além disso, seria útil um método para detetar um evento particular para o cumprimento das normas que requerem a aprovação pré-mercado e a rotulagem de alimentos derivados de plantas de milho recombinantes, por exemplo. É possível detetar a presença de um transgene por meio de qualquer método bem conhecido de detecção de ácidos nucleicos, incluindo, mas não limitado a, amplificação térmica (reação em cadeia da polimerase (PCR)) usando iniciadores polinucleotídicos ou a hibridização do DNA usando sondas de ácidos nucleicos. Tipicamente, por uma questão de simplicidade e uniformidade de reagentes e metodologias para uso na detecção de um construto de DNA particular que

tenha sido usado para transformar várias variedades de plantas, estes métodos de detecção focam-se em geral em elementos genéticos frequentemente utilizados, por exemplo, genes promotores, terminadores, e marcadores, porque para muitos construtos de DNA, a região da sequência de codificação é intermutável. Como resultado, esses métodos podem não ser úteis para discriminar entre construtos que diferem apenas em relação à sequência de codificação. Para além disso, esses métodos podem não ser úteis para discriminar entre eventos diferentes, em particular entre os produzidos usando o mesmo construto de DNA, salvo se a sequência de DNA cromossómico adjacente ao DNA heterólogo inserido ("DNA flanqueador") for conhecida.

A presente invenção inclui um evento de milho transgénico resistente aos insetos que tem, incorporado no seu genoma, um gene *cry3A055*, divulgado na Publicação Internacional N° WO 03/018810, publicada a 6 de março de 2003, que codifica uma toxina inseticida *Cry3A055*, útil no controlo de pragas de insetos *Diabrotica spp.* O evento de milho transgénico tem também incorporado no seu genoma um gene *pmi*, que codifica uma enzima fosfomanose isomerase (PMI), divulgado na patente US N° 5,767,378, útil como marcador selecionável, o que permite que a planta utilize a manose como fonte de carbono. A presente invenção também inclui novas sequências de ácidos nucleicos isolados que são únicas para o evento de milho transgénico, úteis para identificar o evento de milho transgénico e para detetar ácidos nucleicos do evento de milho transgénico numa amostra biológica, bem como *kits* que compreendem os reagentes necessários para uso na detecção destes ácidos nucleicos numa amostra biológica.

A presente invenção refere-se a um método para identificar uma planta de milho compreendendo o inserto heterólogo de MIR604 compreendendo um gene *cry3A055* de SEQ ID NO: 59 flanqueado por sequências de nucleótidos apresentadas em SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 3, e SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4, respetivamente, ou por seus complementos, dentre outras plantas de milho que não compreendem o referido inserto heterólogo, compreendendo as etapas de:

- (a) amplificação de uma sequência de DNA alvo da planta de milho a ser identificada utilizando iniciadores de nucleótidos compreendendo uma primeira sequência de DNA compreendendo pelo menos cerca de 11 nucleótidos contíguos selecionados do grupo consistindo dos nucleótidos 792-811 de SEQ ID NO: 3; nucleótidos 497-516 de SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; e seus complementos, e uma segunda sequência de DNA, que está compreendida na sequência de DNA do inserto heterólogo selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62; SEQ ID NO: 63, e seus complementos; e
- (b) identificação da planta de milho compreendendo o inserto heterólogo de MIR604 dentre outras plantas de milho.

A invenção refere-se ainda ao uso de uma planta de milho identificada no método acima descrito compreendendo o inserto heterólogo de MIR604 para o controlo de pragas de insetos.

Em particular, a praga de inseto coleóptero é selecionada do grupo consistindo na *Diabrotica virgifera virgifera*, a lagarta da raiz do milho ocidental, *Diabrotica virgifera*

*zcae*, a lagarta da raiz do milho mexicana, e a *Diabrotica longicornis barberi*, a lagarta da raiz do milho do norte.

Em outra forma de realização, a invenção refere-se ao uso descrito acima, em que as sementes da referida planta de milho são tratadas com produtos químicos de tratamento de sementes, em particular para promover um aumento ou sinergia da atividade inseticida da proteína Cry3A055 e/ou para aumentar o espectro de atividade e a eficácia da proteína expressa e do produto químico.

Em uma forma de realização, o referido produto químico é um inseticida, em particular o referido inseticida é Cruiser®.

Quaisquer referências à invenção ou a aspectos ou formas de realização da invenção aqui mencionados, que excedem o âmbito da invenção como representado pelas reivindicações não fazem parte da invenção mas representam informação de base útil apenas para a compreensão da invenção.

A presente invenção refere-se a um evento de milho transgênico, designado MIR604, que compreende um novo genótipo transgênico que compreende um gene *cry3A055* e um gene *pmi* que conferem resistência a insetos e a capacidade de utilizar a manose como fonte de carbono, respetivamente, ao evento de milho MIR604 e à descendência do mesmo. A invenção também proporciona plantas de milho transgênico que compreendem o genótipo da invenção, sementes das plantas de milho transgênico compreendendo o genótipo da invenção, e métodos para produzir uma planta de milho transgênico compreendendo o genótipo da invenção, cruzando um milho puro que compreende o genótipo da invenção com ele próprio ou com uma outra linha de milho de um genótipo

diferente. As plantas de milho transgênico da invenção podem ter essencialmente todas as características morfológicas e fisiológicas da correspondente planta de milho não transgênica isogênica, para além das conferidas à planta de milho pelo novo genótipo da invenção. A presente invenção também proporciona composições e métodos para detetar a presença de ácidos nucleicos do evento MIR604 com base na sequência de DNA de cassetes de expressão recombinantes inseridas no genoma do milho que resultaram no evento MIR604 e de sequências genómicas que flanqueiam o sítio de inserção. O evento MIR604 pode ainda ser caracterizado pela análise dos níveis de expressão das proteínas Cry3A055 e PMI, bem como pelo teste da eficácia contra as lagartas da raiz do milho.

De acordo com um aspeto, a presente invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico isolado que compreende pelo menos 10 nucleótidos contíguos de uma sequência de DNA heterólogo inserida no genoma da planta de milho do evento de milho MIR604 e pelo menos 10 nucleótidos contíguos do DNA do genoma de uma planta de milho que flanqueia o ponto de inserção de uma sequência de DNA heterólogo inserida no genoma da planta de milho do evento de milho MIR604. A molécula de ácido nucleico isolado de acordo com este aspeto pode compreender pelo menos 20 ou pelo menos 50 nucleótidos contíguos de uma sequência de DNA heterólogo inserida no genoma da planta de milho do evento de milho MIR604, e pelo 20 ou pelo menos 50 nucleótidos contíguos do DNA do genoma de uma planta de milho que flanqueia o ponto de inserção de uma sequência de DNA heterólogo inserida no genoma da planta de milho do evento de milho MIR604.

De acordo com um outro aspecto, a presente invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de nucleótidos que compreende pelo menos uma sequência de junção do evento MIR604 selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, e sequências complementares das mesmas. Uma sequência de junção abrange a junção entre o DNA heterólogo compreendendo as cassetes de expressão inseridas no genoma do milho e DNA do genoma do milho que flanqueia o sítio de inserção, e é diagnóstica do evento MIR604.

De acordo com um outro aspecto, a presente invenção proporciona um ácido nucleico isolado que liga uma molécula de DNA heterólogo ao genoma da planta de milho no evento de milho MIR604 compreendendo uma sequência de cerca de 11 a cerca de 20 nucleótidos contíguos selecionados entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, e sequências complementares das mesmas.

De acordo com um outro aspecto a presente invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, e sequências complementares das mesmas.

De acordo com um outro aspecto da invenção, é proporcionado um amplicão que compreende uma molécula de ácido nucleico da invenção.

De acordo ainda com um outro aspecto da invenção, são proporcionados iniciadores da sequência de flanqueamento para detetar o evento MIR604. Tais iniciadores da sequência

de flanqueamento compreendem uma sequência de ácidos nucleicos isolados compreendendo pelo menos 10-15 nucleótidos contíguos dos nucleótidos 1-801 tal como se estabelece na SEQ ID NO: 3 (arbitrariamente designada no presente documento como a sequência de flanqueamento 5'), ou sequências complementares da mesma. Numa forma de realização desse aspeto, os iniciadores da sequência de flanqueamento são selecionados entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, e sequências complementares das mesmas.

Num outro aspeto da invenção, os iniciadores das sequências de flanqueamento compreendem uma sequência de ácidos nucleicos isolados compreendendo pelo menos 10-15 nucleótidos contíguos dos nucleótidos 507-1570 tal como se estabelece na SEQ ID NO: 4 (arbitrariamente designada no presente documento como a sequência de flanqueamento 3'), ou sequências complementares da mesma. Numa forma de realização desse aspeto, os iniciadores da sequência de flanqueamento são selecionados entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, e sequências complementares das mesmas.

De acordo com um outro aspeto da invenção, são proporcionados pares de iniciadores que são úteis para amplificação de ácidos nucleicos, por exemplo. Tais pares de iniciadores compreendem um primeiro iniciador que compreende uma sequência de nucleótidos de pelo menos 10-15 nucleótidos contíguos de comprimento, que é uma das sequências de flanqueamento genómico descritas acima ou uma sequência complementar das mesmas (SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID

NO: 4), e um segundo iniciador que compreende uma sequência de nucleótidos de pelo menos 10-15 nucleótidos contíguos de DNA heterólogo inserido no genoma do evento MIR604. O segundo iniciador compreende de preferência uma sequência de nucleótidos que é a sequência de inserção adjacente à sequência de DNA de flanqueamento genómico da planta ou uma sequência complementar da mesma, tal como se estabelece na SEQ ID NO: 3 da posição nucleotídica 802 à 1310 e na SEQ ID NO: 4 da posição nucleotídica 1 à 506.

De acordo com um outro aspeto da invenção, são proporcionados métodos de detetar a presença de DNA correspondente ao evento MIR604 numa amostra biológica. Tais métodos compreendem: (a) o contacto da amostra compreendendo DNA com um par de iniciadores que, quando usados numa reação de amplificação de ácidos nucleicos com DNA genómico do evento de milho MIR604, produzem um amplicão que é diagnóstico do evento de milho MIR604; (b) a realização de uma reação de amplificação de ácidos nucleicos, produzindo deste modo o amplicão; e (c) a deteção do amplicão. Numa forma de realização desse aspeto, o amplicão compreende uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, e SEQ ID NO: 4, e sequências complementares das mesmas.

De acordo com um outro aspeto, a invenção proporciona métodos de detetar a presença de um DNA correspondente ao evento MIR604 numa amostra biológica. Tais métodos compreendem: (a) o contacto da amostra compreendendo DNA com uma sonda que se hibridiza em condições de alta estrringência com DNA genómico do evento de milho MIR604 e não se hibridiza em condições de alta estrringência com DNA de uma planta de milho de controlo; (b) a submissão da

amostra e da sonda a condições de hibridização de alta estringência; e (c) a detecção da hibridização da sonda com o DNA.

De acordo com um outro aspeto da invenção, é proporcionado um *kit* para a detecção de ácidos nucleicos do evento MIR604 numa amostra biológica. O *kit* inclui pelo menos uma sequência de DNA que compreende um comprimento suficiente de polinucleótidos que é a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, ou SEQ ID NO: 4, ou uma sequência complementar das mesmas, em que as sequências de DNA são úteis como iniciadores ou sondas que se hibridizam com DNA isolado do evento MIR604, e que, por amplificação de uma sequência de ácidos nucleicos ou hibridização com a mesma numa amostra, seguida de detecção do amplicão ou hibridização com a sequência-alvo, são diagnósticas da presença de sequências de ácidos nucleicos do evento MIR604 na amostra. O *kit* inclui ainda outros materiais necessários para permitir a utilização de métodos de hibridização ou amplificação de ácidos nucleicos.

Num outro aspeto, a presente invenção proporciona um método de detetar a proteína do evento de milho MIR604 numa amostra biológica, que compreende: (a) a extração da proteína de uma amostra de tecido de evento de milho MIR604; (b) a análise da proteína extraída usando um método imunológico que compreende um anticorpo específico para a proteína inseticida ou marcadora selecionável produzida pelo evento MIR604; e (c) a detecção da ligação do referido anticorpo à proteína inseticida ou marcadora selecionável.

Num outro aspeto, a presente invenção proporciona uma amostra biológica derivada de uma planta, tecido, ou

semente de milho do evento MIR604, em que a amostra compreende uma sequência de nucleótidos que é uma sequência selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, ou que é complementar das mesmas, e em que a sequência é detetável na amostra usando um método de amplificação de ácidos nucleicos ou de hibridização de ácidos nucleicos. Numa forma de realização desse aspeto, a amostra é selecionada entre o grupo que consiste em farinha de milho, fubá, xarope de milho, óleo de milho, amido de milho, e cereais fabricados no seu todo ou em parte de modo a conterem subprodutos de milho.

Num outro aspeto, a presente invenção proporciona um extrato derivado de uma planta, tecido, ou semente de milho do evento MIR604, que compreende uma sequência de nucleótidos que é uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, ou que é complementar das mesmas. Numa forma de realização desse aspeto, a sequência é detetável no extrato usando um método de amplificação de ácidos nucleicos ou de hibridização de ácidos nucleicos. Numa outra forma de realização desse aspeto, a amostra é selecionada entre o grupo que consiste em farinha de milho, fubá, xarope de milho, óleo de milho, amido de milho, e cereais fabricados no seu todo ou em parte de modo a conterem subprodutos de milho.

De acordo com um outro aspeto da invenção, são proporcionadas plantas e sementes de milho compreendendo as moléculas de ácidos nucleicos da invenção.

De acordo com um outro aspeto, a presente invenção proporciona um método para produzir uma planta de milho

resistente pelo menos à infestação pela lagarta da raiz do milho, que compreende: (a) o cruzamento sexual de uma primeira planta de milho progenitora com uma segunda planta de milho progenitora, em que a referida primeira ou segunda planta de milho progenitora compreende DNA do evento de milho MIR604, produzindo-se assim uma pluralidade de plantas descendentes de primeira geração; (b) a seleção de uma planta descendente de primeira geração que é resistente pelo menos à infestação pela lagarta da raiz do milho; (c) a autofecundação da planta descendente de primeira geração, produzindo-se deste modo uma pluralidade de plantas descendentes de segunda geração; (d) a seleção entre as plantas descendentes de segunda geração, de uma planta que seja resistente pelo menos à infestação pela lagarta da raiz do milho; em que as plantas descendentes de segunda geração compreendem uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2.

De acordo ainda com um outro aspeto, a presente invenção proporciona um método para produzir sementes de milho, que compreende o cruzamento de uma primeira planta de milho progenitora com uma segunda planta de milho progenitora e a colheita das sementes de milho resultantes de primeira geração, em que a primeira ou segunda planta de milho progenitora é uma planta de milho puro da invenção.

De acordo com um outro aspeto, a presente invenção proporciona um método para produzir sementes de milho híbrido que compreende as etapas de: (a) plantação das sementes de uma primeira linha de milho puro de acordo com a invenção e sementes de uma segunda linha de milho puro com um genótipo diferente; (b) o cultivo de plantas de

milho resultantes da referida plantação até à época da floração; (c) a emasculação das flores das plantas de milho de uma das linhas de milho puro; (d) a permissão da ocorrência de polinização da outra linha pura, e (e) a colheita da semente híbrida produzida deste modo.

O exposto e outros aspetos da invenção tornar-se-ão mais evidentes a partir da descrição detalhada que se segue.

#### Descrição das Sequências na Listagem de Sequências

A SEQ ID NO: 1 é a junção 5' genoma-inserção.

A SEQ ID NO: 2 é a junção 3' inserção-genoma.

A SEQ ID NO: 3 é a sequência 5' genoma + inserção.

A SEQ ID NO: 4 é a sequência 3' inserção + genoma.

A SEQ ID NO: 5 é o genoma do milho que flanqueia a extremidade 5' da inserção.

A SEQ ID NO: 6 é o genoma do milho que flanqueia a extremidade 3' da inserção.

As SEQ ID NOs: 7-15 são iniciadores da sequência de flanqueamento 5' úteis na presente invenção.

As SEQ ID NOs: 16-20 são iniciadores da sequência promotora MTL úteis na presente invenção.

As SEQ ID NOs: 21-28 são iniciadores da sequência *cry3A055* úteis na presente invenção.

As SEQ ID NOs: 29-30 são iniciadores da sequência *ZmUbiInt* úteis na presente invenção.

As SEQ ID NOs: 31-37 são iniciadores da sequência *pmi* úteis na presente invenção.

A SEQ ID NO: 38 é um iniciador da sequência NOS útil na presente invenção.

As SEQ ID NOs: 39-46 são iniciadores da sequência de flanqueamento 3' úteis na presente invenção.

As SEQ ID NOs: 47-49 são os iniciadores e a sonda TAQMAN® para o gene *cry3A055*.

As SEQ ID NOs: 50-52 são os iniciadores e a sonda TAQMAN® para o gene *pmi*.

As SEQ ID NOs: 53-55 são os iniciadores e a sonda TAQMAN® para ZmADH.

A SEQ ID NO: 56 é uma sonda MIR604 útil na presente invenção.

A SEQ ID NO: 57 é a sequência para a região de fronteira direita.

A SEQ ID NO: 58 é a sequência do promotor MTL.

A SEQ ID NO: 59 é a sequência do gene *cry3A055*.

A SEQ ID NO: 60 é a sequência do terminador NOS.

A SEQ ID NO: 61 é a sequência do promotor ZmUbiInt.

A SEQ ID NO: 62 é a sequência do gene *pmi*.

A SEQ ID NO: 63 é a sequência para a região de fronteira esquerda.

#### Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 ilustra um vetor de expressão da planta designado pZM26. A Map identifica o sítio de restrição KpnI usado para análise *Southern*.

A Figura 2 é um mapa gráfico que ilustra a organização dos elementos que compreendem as sequências de ácidos nucleicos heterólogos inseridas no genoma do evento de milho MIR604 e estabelece as posições relativas nas quais as sequências de ácidos nucleicos inseridas se ligam às sequências de DNA genômico do milho que flanqueiam as extremidades das sequências de DNA heterólogo inseridas. 1= genoma da planta que flanqueia a extremidade 5' (SEQ ID NO: 5); 2 = região de fronteira direita (SEQ ID NO: 57); 3 = promotor MTL (SEQ ID NO: 58); 4 = gene *cry3A055* (SEQ ID NO: 59); 5 =

terminador NOS (SEQ ID NO: 60); 6 = promotor ZmUbiINT (SEQ ID NO: 61); 7 = gene pmi (SEQ ID NO: 62); 8 = terminador NOS (SEQ ID NO: 60); 9 = região de fronteira esquerda (SEQ ID NO: 63); e 10 = genoma da planta que flanqueia a extremidade 3' (SEQ ID NO: 6).

## **DEFINIÇÕES**

São fornecidas as definições e métodos que se seguem para melhor se definir a presente invenção e para orientar os peritos na técnica na prática da presente invenção. Salvo indicação em contrário, os termos usados no presente documento são para ser entendidos de acordo com a utilização convencional pelos peritos na técnica relevante. As definições dos termos comuns em biologia molecular podem também ser encontradas em Rieger *et al.*, Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5<sup>a</sup> edição, Springer-Verlag: Nova Iorque, 1994.

Tal como se usa no presente documento, o termo "amplificado/a" significa a construção de múltiplas cópias de uma molécula de ácido nucleico ou de múltiplas cópias complementares da molécula de ácido nucleico usando pelo menos uma das moléculas de ácido nucleico como modelo. Os sistemas de amplificação incluem o sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR), sistema de reação em cadeia da ligase (LCR), amplificação com base na sequência de ácidos nucleicos (NASBA, Cangene, Mississauga, Ontário), sistemas Replicase Q-Beta, sistema de amplificação à base de transcrição (TAS), e amplificação por deslocamento da cadeia (SDA). Ver, por exemplo, *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, D. H. Persing *et al.*, Ed., American Society for Microbiology, Washington,

D.C. (1993). O produto de amplificação é denominado um amplificação.

Uma "sequência de codificação" é uma sequência de ácidos nucleicos que é transcrita para o RNA tal como mRNA, rRNA, tRNA, snRNA, RNA senso ou RNA antissenso. De preferência, o RNA é então traduzido num organismo para produzir uma proteína.

Um "*kit* de detecção", tal como usado no presente documento, refere-se a um *kit* usado para detetar a presença ou a ausência de DNA de plantas MIR604 numa amostra que compreende sondas e iniciadores de ácidos nucleicos da presente invenção, que se hibridizam especificamente em condições de alta estringência com uma sequência-alvo de DNA, e outros materiais necessários para permitir a utilização de métodos de hibridização ou amplificação de ácidos nucleicos.

1 Tal como se usa no presente documento, o termo "evento" transgénico refere-se a uma planta recombinante produzida por transformação e regeneração da célula de uma única planta com DNA heterólogo por exemplo, uma cassete de expressão que inclui um gene de interesse. O termo "evento" refere-se ao transformante e/ou descendência originais do transformante que incluem o DNA heterólogo. O termo "evento" refere-se também à descendência produzida por fecundação cruzada entre o transformante e uma outra linha de milho. Mesmo depois de retrocruzamento repetido de um progenitor recorrente, o DNA inserido e o DNA de flaqueamento do progenitor transformado estão presentes na descendência do cruzamento na mesma localização cromossómica. Normalmente, a transformação de tecidos da

planta produz múltiplos eventos, em que cada um representa a inserção de um construto de DNA numa localização diferente no genoma da célula de uma planta. Com base na expressão do transgene ou outras características desejáveis, seleciona-se um evento particular. Assim, "evento MIR604", ou "MIR604", tal como se usa no presente documento, designa o transformante original MIR604 e/ou a descendência do transformante MIR604.

"Cassete de Expressão", tal como usada no presente documento, designa uma molécula de ácido nucleico capaz de dirigir a expressão de uma sequência particular de nucleótidos numa célula hospedeira apropriada, que compreende um promotor operacionalmente ligado à sequência de nucleótidos de interesse operacionalmente ligada a sinais de terminação. Compreende também tipicamente sequências necessárias para a tradução apropriada da sequência de nucleótidos. A cassete de expressão pode compreender também sequências não necessárias à expressão direta de uma sequência de nucleótidos de interesse, mas que estão presentes devido a sítios de restrição convenientes para a remoção da cassete de um vetor de expressão. A cassete de expressão que compreende a sequência de nucleótidos de interesse pode ser quimérica, o que significa que pelo menos um dos seus componentes é heterólogo no que diz respeito a pelo menos um dos seus outros componentes. A cassete de expressão pode também ser uma que ocorra naturalmente, mas que tenha sido obtida de forma recombinante, útil para expressão heteróloga. Tipicamente, no entanto, a cassete de expressão é heteróloga no que diz respeito ao hospedeiro, isto é, a sequência particular de ácidos nucleicos da cassete de expressão não ocorre naturalmente na célula hospedeira e

tem que ter sido introduzida na célula hospedeira ou num antepassado da célula hospedeira por meio de um processo de transformação conhecido na técnica. A expressão da sequência de nucleótidos na cassete de expressão pode estar sob controlo de um promotor constitutivo ou de um promotor induzível que inicia a transcrição apenas quando a célula hospedeira está exposta a algum estímulo externo particular. No caso de um organismo multicelular, tal como uma planta, o promotor pode também ser específico de um tecido particular ou órgão, ou de uma fase de desenvolvimento. Uma cassete de expressão, ou um fragmento da mesma, pode também ser referida como uma "sequência inserida" ou "sequência de inserção" quando transformada numa planta.

Um "gene" é uma região definida que se localiza num genoma e que, para além da sequência de ácidos nucleicos codificadora acima mencionada, compreende outras sequências de ácidos nucleicos essencialmente reguladoras, responsáveis pelo controlo da expressão, ou seja, da transcrição e tradução da parte de codificação. Um gene pode também compreender outras sequências 5' e 3' não traduzidas e sequências de terminação. Outros elementos que podem estar presentes são, por exemplo, intrões.

"Gene de interesse" refere-se a qualquer gene que, quando transferido para uma planta, confere à planta uma característica desejada tal como resistência a antibióticos, resistência a vírus, resistência a insetos, resistência a doença, ou resistência a outras pragas, tolerância a herbicidas, melhoria do valor nutricional, melhoria do desempenho num processo industrial ou alteração da capacidade reprodutora. O "gene de interesse" pode

também ser um gene que é transferido para plantas para a produção de enzimas ou metabolitos comercialmente valiosos na planta.

"Genótipo", tal como usado no presente documento é o material genético herdado de plantas de milho progenitoras, o qual nem todo é necessariamente expresso nas plantas de milho descendentes. O genótipo MIR604 refere-se ao material genético heterólogo transformado no genoma de uma planta, bem como ao material genético que flanqueia a sequência inserida.

Uma sequência de ácidos nucleicos "heteróloga" é uma sequência de ácidos nucleicos associada não naturalmente a uma célula hospedeira na qual é ela introduzida, incluindo múltiplas cópias que ocorrem não naturalmente de uma sequência de ácidos nucleicos que ocorre naturalmente.

Uma sequência de ácidos nucleicos "homóloga" é uma sequência de ácidos nucleicos naturalmente associada a uma célula hospedeira na qual ela é introduzida.

"Operacionalmente ligado/a" refere-se à associação de sequências de ácidos nucleicos num único fragmento de ácidos nucleicos de tal modo que a função de uma afeta a função da outra. Por exemplo, um promotor está operacionalmente ligado a uma sequência de codificação ou a RNA funcional quando é capaz de afetar a expressão dessa sequência codificadora ou desse RNA funcional (isto é, a sequência de codificação ou RNA funcional está sob o controlo transcricional do promotor). As sequências de codificação na orientação senso ou antissenso podem estar operacionalmente ligadas a sequências reguladoras.

"Iniciadores", tal como se usa no presente documento, são ácidos nucleicos isolados que são hibridizados com uma cadeia de DNA-alvo complementar por meio de hibridização de ácidos nucleicos para formar um híbrido entre o iniciador e a cadeia de DNA-alvo, e de seguida estendidos ao longo da cadeia de DNA-alvo por uma polimerase tal como a DNA polimerase. Podem ser usados pares ou conjuntos de iniciadores para amplificação de uma molécula de ácido nucleico, por exemplo, pela reação em cadeia da polimerase (PCR) ou outros métodos convencionais de amplificação de ácidos nucleicos.

Uma "sonda" é um ácido nucleico isolado ao qual está ligado um marcador convencional detetável ou uma sonda molecular, tal como um isótopo radioativo, ligando, agente quimiluminescente, ou enzima. Uma tal sonda é complementar de uma cadeia de um ácido nucleico alvo, no caso da presente invenção, de uma cadeia de DNA genómico do evento de milho MIR604. O DNA genómico do MIR604 pode ser de uma planta de milho ou de uma amostra que inclui DNA do evento. As sondas de acordo com a presente invenção incluem não apenas ácidos desoxirribonucleicos ou ribonucleicos, mas também poliamidas e outros materiais de sondagem que se ligam especificamente a uma sequência-alvo de DNA e podem ser usadas para detetar a presença dessa sequência-alvo de DNA.

Os iniciadores e as sondas têm em geral entre 10 e 15 nucleótidos ou mais de comprimento. Os iniciadores e as sondas podem também ter pelo menos 20 nucleótidos ou mais de comprimento, ou pelo menos 25 nucleótidos ou mais, ou pelo menos 30 nucleótidos ou mais de comprimento. Tais

iniciadores e sondas hibridizam-se especificamente com uma sequência-alvo em condições de hibridização de alta estringência. Os iniciadores e as sondas de acordo com a presente invenção podem ter uma complementaridade completa de sequências com a sequência-alvo, embora as sondas que diferem da sequência-alvo e que retêm a capacidade de se hibridizarem com sequências-alvo possam ser concebidas por métodos convencionais.

"Condições de estringência" ou "condições de hibridização de estringência" incluem referência a condições sob as quais uma sonda se hibridizará com a sua sequência-alvo, num grau detetável superior do que com outras sequências. As condições de estringência dependem da sequência-alvo e irão diferir dependendo da estrutura do polinucleótido. Controlando a estringência das condições de hibridização e/ou lavagem, podem ser identificadas as sequências-alvo que são 100% complementares da sonda (sondagem homóloga). Alternativamente, as condições de estringência podem ser ajustadas para permitir algumas incompatibilidades nas sequências, de tal modo que sejam detetados graus de semelhança inferiores (sondagem heteróloga). As sequências mais compridas hibridizam-se especificamente a temperaturas mais altas. Um guia extenso sobre a hibridização de ácidos nucleicos é encontrado em Tijssen (1993), *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; e *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2, Ausubel et al., Eds., Greene Publishing e Wiley-Interscience: Nova Iorque (1995), e também em Sambrook et al. (2001),

*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (5<sup>a</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

A especificidade é tipicamente uma função das lavagens pós-hibridização, sendo os fatores críticos a força iônica e a temperatura da solução de lavagem final. Em geral, as condições de hibridização e de lavagem de alta estringência são selecionadas de modo a serem cerca de 5 °C abaixo do ponto de fusão térmico ( $T_m$ ) para a sequência específica a uma força iônica e pH definidos. A  $T_m$  é a temperatura (sob força iônica e pH definidos) à qual 50% da sequência-alvo se hibridiza com uma sonda perfeitamente compatível. Tipicamente, em condições de alta estringência, uma sonda hibridizar-se-á com a sua subsequência-alvo, mas não com outras sequências.

Um exemplo de condições de hibridização de alta estringência para hibridização de ácidos nucleicos complementares que têm mais de 100 resíduos complementares num filtro num *Southern* ou *northern blot* é 50% de formamida com 1 mg de heparina a 42 °C, sendo a hibridização levada a cabo de um dia para o outro. Um exemplo de condições de lavagem de muito alta estringência é NaCl 0,15 M a 72 °C durante cerca de 15 minutos. Um exemplo de condições de lavagem de alta estringência é uma lavagem com 0,2x SSC a 65 °C durante 15 minutos (ver, Sambrook, *infra*, para uma descrição do tampão SSC).

Condições de hibridização exemplificativas para a presente invenção incluem a hibridização em SDS a 7%, NaPO<sub>4</sub> 0,25 M, pH 7,2 a 67 °C de um dia para o outro, seguida de duas lavagens com SDS a 5%, NaPO<sub>4</sub> 0,20 M, pH 7,2 a 65 °C durante 30 minutos cada lavagem, e duas lavagens com SDS a 1%,

$\text{NaPO}_4$  0,20 M, pH 7,2 a 65 °C durante 30 minutos cada lavagem. Um exemplo de uma lavagem de estringência média para um duplex de, por exemplo mais de 100 nucleótidos, é 1x SSC a 45 °C durante 15 minutos. Um exemplo de uma lavagem de estringência baixa para um duplex de, por exemplo, mais de 100 nucleótidos, é 4-6x SSC a 40 °C durante 15 minutos.

Para sondas de cerca de 10 a 50 nucleótidos, as condições de alta estringência envolvem tipicamente concentrações salinas de ião Na de menos de cerca de 1,0 M, tipicamente uma concentração de ião Na (ou de outros sais) de cerca de 0,41 a 1,0 M a pH entre 7,0 e 8,3, e a temperatura é tipicamente pelo menos de cerca de 30 °C. As condições de alta estringência podem também ser alcançadas com a adição de agentes desestabilizadores tais como a formamida. Em geral, uma razão sinal para ruído de 2x (ou superior) em relação à observada para uma sonda não relacionada no ensaio de hibridização particular indica a detecção de uma hibridização específica. Os ácidos nucleicos que não se hibridizam uns com os outros em condições de alta estringência são ainda essencialmente idênticos se as proteínas que codificam forem essencialmente idênticas. Isto ocorre, p. ex., quando uma cópia de um ácido nucleico é criada usando a degeneração máxima de codão permitida pelo código genético.

Os conjuntos que se seguem são exemplificativos de condições de hibridização/lavagens que podem ser usadas para hibridizar sequências de nucleótidos que são essencialmente idênticas a sequências de nucleótidos de referência da presente invenção: uma sequência de nucleótidos de referência hibridiza-se de preferência com a

sequência de nucleótidos de referência em dodecilsulfato de sódio (SDS) a 7%,  $\text{NaPO}_4$  0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C com lavagem com 2X SSC, SDS a 0,1% e a 50 °C, mais desejavelmente em dodecilsulfato de sódio (SDS) a 7%,  $\text{NaPO}_4$  0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C com lavagem com 0,1X SSC, SDS a 0,1% e a 50 °C, mais desejavelmente ainda em dodecilsulfato de sódio (SDS) a 7%,  $\text{NaPO}_4$  0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C com lavagem com 0,5X SSC, SDS a 0,1% e a 50 °C, de preferência em dodecilsulfato de sódio (SDS) a 7%,  $\text{NaPO}_4$  0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C com lavagem com 0,1X SSC, SDS a 0,1% e a 50 °C, mais de preferência em dodecilsulfato de sódio (SDS) a 7%,  $\text{NaPO}_4$  0,5 M, EDTA 1 mM a 50 °C com lavagem com 0,1X SSC, SDS a 0,1% e a 65 °C. As sequências da presente invenção podem ser detetadas usando todas as condições acima. Com o objetivo de definir a invenção, utilizam-se condições de alta estringência.

"Transformação" é um processo para introduzir ácidos nucleicos heterólogos numa célula hospedeira ou num organismo. Em particular, "transformação" designa a integração estável de uma molécula de DNA no genoma de um organismo de interesse.

"Transformado / transgênico / recombinante" refere-se a um organismo hospedeiro tal como uma bactéria ou uma planta, no qual uma molécula de ácido nucleico heterólogo foi introduzida. A molécula de ácido nucleico pode ser integrada de forma estável no genoma do hospedeiro ou a molécula de ácido nucleico pode também estar presente como uma molécula extracromossômica. Uma tal molécula extracromossômica pode ser autorreplicante. Entende-se que as células, tecidos ou plantas transformadas englobam não apenas o produto final de um processo de transformação, mas

também a sua descendência transgênica. Um hospedeiro "não transformado", "não transgênico", ou "não recombinante" refere-se a um organismo do tipo selvagem, p. ex., a uma bactéria ou planta, que não contém a molécula de ácido nucleico heterólogo. Tal como usado no presente documento, "transgênico" refere-se a uma planta, célula de uma planta, ou a uma variedade de células de plantas estruturadas ou não estruturadas que tem integrada, através de técnicas bem conhecidas de manipulação genética e inserção de genes, uma sequência de ácidos nucleicos que representa um gene de interesse no genoma da planta, e tipicamente num cromossoma do núcleo de uma célula, mitocôndria ou outros organelos contendo cromossomas, num locus diferente do, ou num número de cópias superior ao, normalmente presente na planta nativa ou na célula da planta. As plantas transgênicas resultam da manipulação e inserção de tais sequências de ácidos nucleicos em oposição às mutações que ocorrem naturalmente, para produzir uma planta que não ocorre naturalmente ou uma planta com um genótipo que não ocorre naturalmente. As técnicas para a transformação de plantas e de células de plantas são bem conhecidas na técnica e podem compreender por exemplo a eletroporação, microinjeção, transformação mediada por agrobactérias, e a transformação balística.

Utiliza-se no presente documento a nomenclatura para as bases do DNA e aminoácidos como estabelecida em 37 C.F.R. § 1.822.

Esta invenção refere-se a uma linha de milho geneticamente melhorada que produz a proteína de controlo de insetos, Cry3A055, e uma enzima fosfomanose isomerase (PMI) que permite que a planta utilize a manose como fonte de

carbono. A invenção refere-se particularmente a um evento de milho transgênico designado MIR604 que compreende um novo genótipo, bem como a composições e métodos para detetar ácidos nucleicos deste evento numa amostra biológica. A invenção refere-se ainda a plantas de milho que compreendem o genótipo MIR604, a sementes transgênicas das plantas de milho e a métodos para produzir uma planta de milho que compreende o genótipo MIR604, cruzando um milho puro compreendendo o genótipo MIR604 com ele próprio ou com uma outra linha de milho. As plantas de milho que compreendem o genótipo MIR604 da invenção são úteis no controlo de pragas de insetos coleópteros incluindo a *Diabrotica virgifera virgifera*, a lagarta da raiz do milho ocidental, *D. virgifera zea*, a lagarta da raiz do milho mexicana, e a *D. longicornis barberi*, a lagarta da raiz do milho do norte. As plantas de milho que compreendem o genótipo MIR604 da invenção são também capazes de utilizar a manose como fonte de carbono.

Numa forma de realização, a presente invenção abrange uma molécula de ácido nucleico isolado que compreende pelo menos 10 ou mais (por exemplo 15, 20, 25, ou 50) nucleótidos contíguos de uma sequência de DNA heterólogo inserida no genoma da planta de milho do evento de milho MIR604, e pelo menos 10 ou mais (por exemplo 15, 20, 25, ou 50) nucleótidos contíguos do DNA do genoma de uma planta de milho que flanqueia o ponto de inserção de uma sequência de DNA heterólogo inserida no genoma da planta de milho do evento de milho MIR604. São também incluídas sequências de nucleótidos que compreendem 10 ou mais nucleótidos da sequência de inserção contígua do evento MIR604 e pelo menos um nucleótido do DNA flanqueador do evento MIR604 adjacente à sequência de inserção. Tais sequências de

nucleótidos são diagnósticas do evento MIR604. A amplificação de ácidos nucleicos do DNA genómico do evento MIR604 produz um amplicão que compreende tais sequências diagnósticas de nucleótidos.

Numa outra forma de realização, a invenção abrange uma molécula de ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de nucleótidos que compreende pelo menos uma sequência de junção do evento MIR604, selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 e sequências complementares das mesmas, em que uma sequência de junção abrange a junção entre uma cassete de expressão heteróloga inserida no genoma do milho e DNA do genoma do milho que flanqueia o sítio de inserção, e é diagnóstica do evento.

Numa outra forma de realização, a presente invenção abrange um ácido nucleico isolado que liga uma molécula de DNA heterólogo ao genoma da planta de milho no evento de milho MIR604, compreendendo uma sequência de cerca de 11 a cerca de 20 nucleótidos contíguos selecionados entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, e sequências complementares das mesmas.

Numa outra forma de realização, a presente invenção abrange uma molécula de ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, e sequências complementares das mesmas.

Numa forma de realização da presente invenção, é proporcionado um amplicão que compreende uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na SEQ

ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, e sequências complementares das mesmas.

Numa outra forma de realização, a presente invenção abrange iniciadores da sequência de flanqueamento para detetar o evento MIR604. Tais iniciadores da sequência de flanqueamento compreendem uma sequência de ácidos nucleicos isolados compreendendo pelo menos 10-15 nucleótidos contíguos dos nucleótidos 1-801 da SEQ ID NO: 3 (arbitrariamente designada no presente documento como a sequência de flanqueamento 5'), ou sequências complementares da mesma. Num aspeto dessa forma de realização, os iniciadores da sequência de flanqueamento são selecionados entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, e sequências complementares das mesmas.

Numa outra forma de realização, a presente invenção abrange iniciadores das sequências de flanqueamento que compreendem pelo menos 10-15 nucleótidos contíguos dos nucleótidos 507-1570 da SEQ ID NO: 4 (arbitrariamente designada no presente documento como a sequência de flanqueamento 3'), ou sequências complementares da mesma. Num aspeto dessa forma de realização, os iniciadores da sequência de flanqueamento são selecionados entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, e sequências complementares das mesmas.

Ainda numa outra forma de realização, a presente invenção abrange um par de iniciadores de polinucleótidos que compreende um primeiro iniciador de polinucleótidos e um

segundo iniciador de polinucleótidos que funcionam conjuntamente na presença de um modelo de DNA do evento de milho MIR604 numa amostra, para produzirem um amplicão diagnóstico do evento de milho MIR604, em que a primeira sequência de iniciadores é o genoma de uma planta de milho, ou uma sequência complementar do mesmo, que flanqueia o ponto de inserção de uma sequência de DNA heterólogo inserida no genoma da planta de milho do evento de milho MIR604, e a segunda sequência de iniciadores de polinucleótidos é a sequência do DNA heterólogo, ou é uma sequência complementar da mesma, inserida no genoma da planta de milho do evento de milho MIR604.

Num aspeto dessa forma de realização, o primeiro iniciador de polinucleótidos compreende pelo menos 10 nucleótidos contíguos da posição 1-801 da SEQ ID NO: 3 ou sequências complementares da mesma. Num outro aspeto dessa forma de realização, o primeiro iniciador de polinucleótidos compreende a sequência de nucleótidos estabelecida na SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, ou sequências complementares das mesmas. Num outro aspeto dessa forma de realização, o primeiro iniciador de polinucleótidos compreende pelo menos 10 nucleótidos contíguos da posição 507-1570 da SEQ ID NO: 4 ou de sequências complementares da mesma. Num outro aspeto dessa forma de realização, o primeiro iniciador de polinucleótidos compreende a sequência de nucleótidos estabelecida na SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, ou sequências complementares das mesmas. Ainda num outro aspeto dessa forma de realização, o segundo iniciador de polinucleótidos compreende pelo menos 10

nucleótidos contíguos da SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, ou de sequências complementares das mesmas. Ainda num outro aspeto dessa forma de realização, o segundo iniciador de polinucleótidos compreende a sequência de nucleótidos estabelecida nas sequências SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 38, ou em sequências complementares das mesmas.

Num outro aspeto dessa forma de realização, o primeiro iniciador de polinucleótidos que é estabelecido na SEQ ID NO: 15, e o segundo iniciador de polinucleótidos que é estabelecido na SEQ ID NO: 28, funcionam conjuntamente na presença de um modelo de DNA do evento de milho MIR604 numa amostra, para produzir um amplicão diagnóstico do evento de milho MIR604 tal como se descreve no Exemplo 4. Num outro aspeto dessa forma de realização, o primeiro iniciador de polinucleótidos que é estabelecido na SEQ ID NO: 45, e o segundo iniciador de polinucleótidos que é estabelecido na SEQ ID NO: 27, funcionam conjuntamente na presença de um modelo de DNA do evento de milho MIR604 numa amostra para produzir um amplicão diagnóstico do evento de milho MIR604 tal como se descreve no Exemplo 4.

Naturalmente que se encontra bem dentro das competências da técnica obter-se uma sequência adicional mais para dentro da sequência genómica que flanqueia qualquer das extremidades das sequências de DNA heterólogo inseridas, para uso como sequência iniciadora que possa ser usada em tais pares de iniciadores para amplificar as sequências que são diagnósticas do evento MIR604. Para as finalidades desta divulgação, a frase "mais para dentro da sequência genómica que flanqueia qualquer das extremidades das sequências de DNA heterólogo inseridas" refere-se

especificamente a um movimento sequencial que se afasta das extremidades das sequências de DNA heterólogo inseridas, os pontos nos quais as sequências de DNA inseridas são adjacentes à sequência de DNA genómico nativa, e para dentro do DNA genómico do cromossoma particular no qual as sequências de DNA heterólogo foram inseridas. De preferência, uma sequência de iniciadores correspondente a uma parte da sequência de inserção, ou de uma sequência complementar dela, deve preparar a extensão transcricional de uma cadeia de DNA ou RNA emergente na direção da junção da sequência de flanqueamento mais próxima. Consequentemente, uma sequência de iniciadores correspondente a uma parte da sequência de flanqueamento genómica, ou de uma sequência complementar dela, deve preparar a extensão transcricional de uma cadeia de DNA ou RNA emergente na direção da junção da sequência de flanqueamento mais próxima. Uma sequência iniciadora pode ser uma sequência de DNA heterólogo, ou uma sequência complementar da mesma, inserida no cromossoma da planta, ou uma sequência de flanqueamento do genoma. Um especialista na técnica reconheceria prontamente o benefício de uma sequência de iniciadores ter de ser a sequência, ou ter de ser complementar da sequência, tal como estabelecida na sequência de DNA heterólogo inserida ou tal como estabelecida na SEQ ID NO: 3 ou na SEQ ID NO: 4, dependendo da natureza do produto que se deseja obter, através do uso do conjunto bem implantado de iniciadores destinado a uso na amplificação de uma sequência particular de flanqueamento contendo a junção entre a sequência de DNA genómico e a sequência de DNA heterólogo inserida.

Numa outra forma de realização, a presente invenção abrange um método de detetar a presença de DNA correspondente ao

evento MIR604 numa amostra biológica, em que o método compreende: (a) o contacto da amostra compreendendo DNA com uma sonda que se hibridiza em condições de alta estringência com DNA genómico do evento de milho MIR604 e não se hibridiza em condições de alta estringência com DNA de uma planta de milho de controlo; (b) a submissão da amostra e da sonda a condições de hibridização de alta estringência; e (c) a deteção da hibridização da sonda com o DNA. Num aspeto dessa forma de realização, o amplicão compreende uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, e sequências complementares das mesmas.

Numa outra forma de realização, a presente invenção abrange um método de detetar a presença de um DNA correspondente ao evento MIR604 numa amostra biológica, em que o método compreende: (a) o contacto da amostra compreendendo DNA com uma sonda que se hibridiza em condições de alta estringência com DNA genómico do evento de milho MIR604 e não se hibridiza em condições de alta estringência com DNA de uma planta de milho de controlo; (b) a submissão da amostra e da sonda a condições de hibridização de alta estringência; e (c) a deteção da hibridização da sonda com o DNA. A deteção pode ser feita por qualquer meio conhecido na técnica, incluindo mas não se limitando a meios fluorescentes, quimiluminescentes, radiológicos, imunológicos ou outros. No caso em que se pretenda usar a hibridização como meio de amplificação de uma sequência particular para produzir um amplicão que é diagnóstico do evento de milho MIR604, pretende-se que a produção e deteção por qualquer meio bem conhecido na técnica dos amplicões sejam indicativas da hibridização pretendida com

a sequência-alvo em que se utiliza uma sonda ou iniciador, ou sequências em que se utilizam duas ou mais sondas ou iniciadores. O termo "amostra biológica" destina-se a compreender uma amostra que contém ou se suspeita conter um ácido nucleico que compreende entre cinco e dez nucleótidos em qualquer dos lados do ponto no qual uma ou outra das duas extremidades terminais da sequência de DNA heterólogo inserida contacta com a sequência de DNA genómico no cromossoma em que a sequência de DNA heterólogo foi inserida, também conhecida no presente documento como sequência de junção. Para além disso, a sequência de junção compreende apenas dois nucleótidos, sendo eles o primeiro nucleótido no DNA genómico de flanqueamento adjacente e covalentemente ligado ao primeiro nucleótido na sequência de DNA heterólogo inserida.

Ainda numa outra forma de realização, a presente invenção abrange um *kit* para detetar a presença de ácidos nucleicos do MIR604 numa amostra biológica, em que o *kit* compreende pelo menos uma molécula de ácido nucleico de comprimento suficiente de nucleótidos contíguos homólogos ou complementares de uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, e SEQ ID NO: 4, que funciona como um iniciador do DNA ou sonda específica para o evento MIR604, e outros materiais necessários para permitir a hibridização ou amplificação de ácidos nucleicos. Pode ser usada uma variedade de métodos de deteção incluindo TAQMAN (Perkin Elmer), amplificação térmica, reação em cadeia da ligase, hibridização *southern*, métodos ELISA, e métodos de deteção colorimétricos e fluorescentes. Em particular, a presente invenção fornece *kits* para detetar a presença da sequência-alvo, isto é, pelo menos uma das junções do DNA de inserção

com o DNA genómico da planta de milho no MIR604, numa amostra contendo ácido nucleico genómico do MIR604. O *kit* é constituído pelo menos por um polinucleótido capaz de se ligar ao sítio-alvo ou essencialmente adjacente ao sítio-alvo, e pelo menos por um meio de detetar a ligação do polinucleótido ao sítio-alvo. Os meios de deteção podem ser fluorescentes, quimiluminescentes, colorimétricos, ou isotópicos, e podem ser acoplados pelo menos a métodos imunológicos para detetar a ligação. É também previsto um *kit* que pode detetar a presença do sítio-alvo numa amostra, isto é, pelo menos uma das junções do DNA de inserção com o DNA genómico da planta de milho no MIR604, tirando proveito de duas ou mais sequências de polinucleótidos que conjuntamente são capazes de se ligar a sequências de nucleótidos adjacentes a ou até cerca de 100 pares de bases, ou até cerca de 200 pares de bases, ou até cerca de 500 pares de bases ou até cerca de 1000 pares de bases da sequência-alvo, e que podem ser estendidas na direção uma(s) da(s) outra(s) para formar um amplicão que contém pelo menos o sítio-alvo.

Numa outra forma de realização, a presente invenção abrange um método de detetar a proteína do evento MIR604 numa amostra biológica, em que o método compreende: (a) a extração da proteína de uma amostra de tecido do evento de milho MIR604; (b) a análise da proteína extraída usando um método imunológico que compreende um anticorpo específico para a proteína inseticida ou marcadora selecionável produzida pelo evento MIR604; e (c) a deteção da ligação do referido anticorpo à proteína inseticida ou marcadora selecionável.

Outra forma de realização da presente invenção abrange uma planta de milho ou partes da mesma, que compreende(m) o

genótipo do evento transgênico MIR604, em que o genótipo compreende a sequência de nucleótidos estabelecida na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, ou sequências complementares das mesmas. Num aspeto dessa forma de realização, a planta de milho é das linhas de milho puro CG5NA58, CG5NA58A, CG3ND97, CG5NA01, CG5NF22, CG4NU15, CG00685, CG00526, CG00716; NP904, NP948, NP934, NP982, NP991, NP993, NP2010, NP2013, NP2015, NP2017, NP2029, NP2031, NP2034, NP2045, NP2052, NP2138, NP2151, NP2166, NP2161, NP2171, NP2174, NP2208, NP2213, NP2222, NP2275, NP2276, NP2316, BCTT609, AF031, H8431, 894, BUTT201, R327H, 2044BT, e 2070BT. Um perito na técnica reconhecerá, no entanto, que o genótipo MIR604 pode ser introgridido em qualquer variedade de plantas que possa ser produzida com milho, incluindo espécies de milho selvagens, e desse modo, as linhas puras preferidas dessa forma de realização não pretendem ser limitativas.

Numa outra forma de realização, a presente invenção abrange uma planta de milho que compreende pelo menos uma primeira e uma segunda sequências de DNA ligadas entre si para formarem uma sequência de nucleótidos contíguos, em que a primeira sequência de DNA está numa sequência de junção e compreende pelo menos cerca de 11 nucleótidos contíguos selecionados entre o grupo que consiste nos nucleótidos 792-811 da SEQ ID NO: 3; nucleótidos 497-516 da SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; e sequências complementares das mesmas, em que a segunda sequência de DNA se encontra na sequência de DNA de inserção heterólogo selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, e sequências complementares das mesmas; e em que a primeira e segunda sequências de DNA são úteis como

iniciadores de nucleótidos ou sondas para a detecção da presença de sequências de ácidos nucleicos do evento de milho MIR604 numa amostra biológica. Num aspeto dessa forma de realização, os iniciadores de nucleótidos são usados num método de amplificação do DNA para amplificar uma sequência de DNA-alvo de DNA-modelo extraído da planta de milho, e a planta de milho é identificável entre outras plantas de milho pela produção de um amplicão correspondente a uma sequência de DNA que compreende a SEQ ID NO: 1 ou a SEQ ID NO: 2.

As plantas de milho da invenção podem ainda ser caracterizadas pelo facto da digestão do DNA genómico da planta com a endonuclease de restrição *KpnI* resultar numa única banda de hibridização *cry3A055* usando uma sonda específica do *cry3A055* em condições de alta estringência. É exemplificada no presente documento uma sonda *cry3A055* que compreende a sequência de nucleótidos estabelecida na SEQ ID NO: 56 ou na SEQ ID NO: 59.

As plantas de milho da invenção podem ainda ser caracterizadas pelo facto da digestão do DNA genómico da planta com a endonuclease de restrição *KpnI* resultar numa única banda de hibridização *pmi* usando uma sonda específica para o *pmi* em condições de alta estringência. É exemplificada no presente documento uma sonda para o *pmi* que compreende a sequência de nucleótidos estabelecida na SEQ ID NO: 62.

Numa forma de realização, a presente invenção proporciona uma planta de milho em que o genótipo MIR604 confere à planta de milho resistência a insetos ou a capacidade para utilizar a manose. Num aspeto dessa forma de realização, o

genótipo que confere à planta de milho resistência a insetos compreende um gene *cry3A055*. Num outro aspeto, o genótipo que confere à planta de milho a capacidade de utilizar a manose compreende um gene *pmi*.

Numa forma de realização, a presente invenção proporciona uma amostra biológica derivada de uma planta, tecido, ou semente de milho do evento MIR604, em que a amostra compreende uma sequência de nucleótidos que é uma sequência selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, ou que é complementar das mesmas, e em que a sequência é detetável na amostra usando um método de amplificação de ácidos nucleicos ou de hibridização de ácidos nucleicos. Num aspeto dessa forma de realização, a amostra é selecionada entre farinha de milho, xarope de milho, óleo de milho, amido de milho, e cereais fabricados no seu todo ou em parte de modo a conter produtos de milho.

Numa outra forma de realização, a presente invenção proporciona um extrato derivado de uma planta, tecido, ou semente de milho do evento MIR604, que compreende uma sequência de nucleótidos que é uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, ou que é complementar das mesmas. Num aspeto dessa forma de realização, a sequência é detetada no extrato usando um método de amplificação de ácidos nucleicos ou de hibridização de ácidos nucleicos. Num outro aspeto dessa forma de realização, a amostra é selecionada entre farinha de milho, xarope de milho, óleo de milho, amido de milho, e cereais fabricados no seu todo ou em parte de modo a conter produtos de milho.

Ainda numa outra forma de realização, a presente invenção proporciona um método para produzir uma planta de milho resistente pelo menos à infestação pela lagarta da raiz do milho, que compreende: (a) o cruzamento sexual de uma primeira planta de milho progenitora com uma segunda planta de milho progenitora, em que a referida primeira ou segunda planta de milho progenitora compreende DNA do evento de milho MIR604, produzindo-se assim uma pluralidade de plantas descendentes de primeira geração; (b) a seleção de uma planta descendente de primeira geração que é resistente pelo menos à infestação pela lagarta da raiz do milho; (c) a autofecundação da planta descendente de primeira geração, produzindo-se deste modo uma pluralidade de plantas descendentes de segunda geração; e (d) a seleção entre as plantas descendentes de segunda geração, de uma planta que seja resistente pelo menos a infestação pela lagarta da raiz do milho; em que as plantas descendentes de segunda geração compreendem uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2.

Numa outra forma de realização, a presente invenção proporciona um método para produzir sementes de milho híbrido que compreende: (a) a plantação das sementes de uma primeira linha de milho puro que compreende uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, e SEQ ID NO: 4, e sementes de uma segunda linha pura com um genótipo diferente; (b) o cultivo de plantas de milho resultantes da referida plantação até à época da floração; (c) a emasculação das referidas flores das plantas de uma das linhas de milho puro; (d) o cruzamento sexual das duas linhas puras diferentes, uma com a outra; e (e) a colheita

da semente híbrida produzida deste modo. Num aspeto dessa forma de realização, a primeira linha de milho puro fornece os progenitores-fêmea. Num outro aspeto dessa forma de realização, a primeira linha de milho puro fornece os progenitores-macho. A presente invenção também abrange a semente híbrida produzida pelo método incorporado e plantas híbridas que cresceram a partir da semente.

Um perito na técnica reconhecerá que o genótipo transgénico da presente invenção pode ser introgridido por reprodução em outras linhas de milho que compreendem diferentes genótipos transgénicos. Por exemplo, uma linha de milho que compreende o genótipo transgénico da presente invenção pode ser cruzada com uma linha de milho que compreende o genótipo transgénico do evento Bt11 resistente aos lepidópteros, que é conhecido na técnica, produzindo assim sementes de milho que compreendem tanto o genótipo transgénico da invenção, como o genótipo transgénico Bt11. Exemplos de outros eventos transgénicos que podem ser cruzados com uma linhagem da presente invenção, incluem os eventos tolerantes ao glifosato GA21 e NK603, o evento MON802 tolerante ao glifosato/resistente aos insetos lepidópteros, o evento DBT418 resistente aos lepidópteros, o evento DAS-06275-8 resistente aos lepidópteros, o evento estéril masculino MS3, o evento B16 tolerante à fosfinotricina, o evento MON 80100 resistente a insetos lepidópteros, os eventos T14 e T25 tolerantes à fosfinotricina, o evento 176 resistente a insetos lepidópteros, e o evento MON863 resistente a coleópteros, todos eles conhecidos na técnica. Será ainda reconhecido que podem ser feitas outras combinações com o genótipo transgénico da invenção e, desse modo estes exemplos não devem ser vistos como limitativos.

Um perito na técnica irá também reconhecer que sementes transgênicas de milho que compreendem o genótipo transgênico da presente invenção, podem ser tratadas com vários produtos químicos de tratamento de sementes, incluindo inseticidas, para aumentar ou sinergizar a atividade inseticida da proteína Cry3A055. Por exemplo, as sementes de milho transgênico da presente invenção podem ser tratadas com o inseticida comercial Cruiser®. Uma tal combinação pode ser usada para aumentar o espectro de atividade e para aumentar a eficácia da proteína expressa e do produto químico.

#### Reprodução

O genótipo transgênico da presente invenção pode ser introgridido em qualquer milho puro ou híbrido usando técnicas de reprodução reconhecidas na técnica. O objetivo da reprodução de plantas é combinar numa única variedade ou híbrido várias características desejáveis. Para colheitas de campo, estas características podem incluir resistência a insetos e doenças, tolerância a herbicidas, tolerância ao calor e à seca, reduzindo o tempo para se atingir a maturidade, um rendimento mais alto, e melhor qualidade agronômica. Com a colheita mecânica de muitas culturas, é importante a uniformidade das características da planta tais como a germinação e o estabelecimento de plântulas, taxa de crescimento, maturidade, e a altura da planta e da espiga.

As colheitas de campo são criadas através de técnicas que tiram proveito do método de polinização da planta. Uma planta é autopolinizada se o pólen de uma flor for

transferido para a mesma ou para outra flor da mesma planta. Uma planta é alogâmica se o pólen for proveniente de uma flor de uma planta diferente.

As plantas que foram autopolinizadas e selecionadas por tipo em muitas gerações tornam-se homozigóticas praticamente em todos os *loci* de genes e produzem uma população uniforme de descendência de reprodução verdadeira. Um cruzamento entre duas linhas homozigóticas diferentes produz uma população uniforme de plantas híbridas que podem ser heterozigóticas para muitos *loci* de genes. Um cruzamento de duas plantas, cada uma delas heterozigótica num certo número de *loci* de genes, produzirá uma população de plantas híbridas que diferem geneticamente e não será uniforme.

O milho pode ser reproduzido tanto por técnicas de autopolinização como de polinização cruzada. O milho tem flores-macho e fêmea separadas na mesma planta, localizadas na bandeira e na espiga, respetivamente. A polinização natural ocorre no milho quando o vento sopra o pólen das bandeiras para as sedas que sobressaem dos topos das espigas.

Um método fiável de controlar a fertilidade masculina nas plantas oferece a oportunidade de melhorar a reprodução de plantas. Isto é especialmente verdade para o desenvolvimento de híbridos de milho, que depende de algum tipo de sistema de esterilidade masculina. Há várias opções disponíveis para os criadores para controlar a fertilidade masculina, tais como a emasculação manual ou mecânica (ou despendoamento), esterilidade masculina citoplasmática,

esterilidade masculina genética, gametocidas e outras semelhantes.

As sementes de milho híbrido são tipicamente produzidas por um sistema de esterilidade masculina que incorpora o despendoamento manual ou mecânico. São plantadas faixas alternadas de duas linhagens de milho num campo, e as bandeiras com pólen são removidas de uma das linhagens (feminina). Desde que exista suficiente isolamento de fontes de pólen estranho de milho, as espigas da linhagem despendoada serão fertilizadas apenas a partir da outra linhagem (masculina), e a semente resultante é, por conseguinte, híbrida e irá formar plantas híbridas.

O processo de despendoamento, laborioso e ocasionalmente falível, pode ser evitado usando um de muitos métodos na técnica de conferir esterilidade masculina genética, cada um com os seus próprios benefícios e desvantagens. Estes métodos usam uma variedade de aproximações tais como a administração à planta de um gene que codifica uma substância citotóxica associada a um promotor específico de tecido masculino ou a um sistema antissenso em que se identifica um gene crítico para a fertilidade e se insere um antissenso para esse gene na planta (ver: Fabijnanski, *et al.* EPO 89/3010153.8 publicação nº 329,308 e pedido PCT PCT/CA90/00037 publicado como WO 90/08828).

#### Desenvolvimento de Linhas de Milho Puro

O uso de linhagens estéreis masculinas é apenas um fator na produção de híbridos de milho. As técnicas de reprodução de plantas conhecidas na técnica e usadas num programa de reprodução de plantas de milho incluem, mas não estão

limitadas a, seleção recorrente, retrocruzamento, seleção, seleção reforçada do polimorfismo do comprimento de restrição, seleção reforçada de marcadores genéticos e transformação. O desenvolvimento de híbridos de milho num programa de reprodução de plantas de milho requer, em geral, o desenvolvimento de linhas puras homozigóticas, o cruzamento destas linhas, e a avaliação dos cruzamentos. Os métodos de reprodução por seleção e seleção recorrente são usados para desenvolver linhas puras a partir de populações para reprodução. Os programas de reprodução de plantas de milho combinam os antecedentes genéticos de duas ou mais linhas puras ou várias outras fontes de germoplasma em *pools* de reprodução, a partir das quais novas linhas puras são desenvolvidas por autopolinização e seleção de fenótipos desejados. As novas linhagens são cruzadas com outras linhas puras e os híbridos destes cruzamentos são avaliados para determinar quais deles têm potencial comercial. A reprodução de plantas e o desenvolvimento híbrido, tal como praticados num programa de reprodução de plantas de milho, são processos dispendiosos e morosos.

A seleção inicia-se com o cruzamento de dois genótipos, cada um dos quais pode ter uma ou mais características desejáveis que falta no outro ou que complementa o outro. Se os dois progenitores originais não fornecerem todas as características desejadas, podem ser incluídas outras fontes na população para reprodução. No método genealógico, as plantas superiores são autopolinizadas e selecionadas em gerações sucessivas. Nas gerações seguintes, a condição heterozigótica abre caminho para linhas homogêneas como resultado de autopolinização e seleção. Tipicamente, no método genealógico de reprodução praticam-se cinco ou mais

gerações de autopolinização e seleção:  $F_1 \rightarrow F_2$ ;  $F_2 \rightarrow F_3$ ;  $F_3 \rightarrow F_4$ ;  $F_4 \rightarrow F_5$ ; etc.

A reprodução por seleção recorrente, retrocruzamento por exemplo, pode ser usada para melhorar uma linha pura e um híbrido que são produzidos usando essas linhagens. O retrocruzamento pode ser usado para transferir uma característica específica desejável de uma linhagem ou fonte para uma linhagem que carece dessa característica. Isto pode ser realizado, por exemplo, cruzando em primeiro lugar uma linhagem superior (progenitor recorrente) com uma linhagem doadora (progenitor não recorrente), que transporta o(s) gene(s) apropriado(s) para a característica em questão. A descendência deste cruzamento é então cruzada novamente com o progenitor recorrente superior, seguindo-se a seleção na descendência resultante para que a característica desejada seja transferida do progenitor não recorrente. Depois de cinco ou mais gerações de retrocruzamento com seleção da característica desejada, a descendência será homozigótica para os *loci* que controlam a característica a ser transferida, mas será como o progenitor superior essencialmente para todos os outros genes. A última geração de retrocruzamento é então autopolinizada para dar uma descendência de reprodução pura para o(s) gene(s) a ser(em) transferido(s). Um híbrido desenvolvido a partir de linhagens contendo o(s) gene(s) transferido(s) é essencialmente o mesmo que um híbrido desenvolvido a partir das mesmas linhagens sem o(s) gene(s) transferido(s).

As linhas puras de elite, isto é, a reprodução pura, linhas puras homozigóticas, podem também ser usadas como materiais de partida para reprodução ou populações-fonte, a partir

das quais se desenvolvem outras linhas puras. Estas linhas puras derivadas de linhas puras de elite podem ser desenvolvidas usando os métodos de reprodução por seleção e seleção recorrente descritos anteriormente. Como exemplo, quando se usa a reprodução por retrocruzamento para criar estas linhas derivadas num programa de reprodução de plantas de milho, podem ser usadas linhagens de elite como linha parental ou material de partida ou população-fonte, e podem servir tanto como progenitor doador como recorrente.

#### Desenvolvimento de Híbridos de Milho

Um híbrido de milho de cruzamento único resulta do cruzamento de duas linhas puras, cada uma das quais tem um genótipo que complementa o genótipo da outra. A descendência híbrida da primeira geração é designada  $F_1$ . No desenvolvimento de híbridos comerciais num programa de reprodução de plantas de milho, apenas as plantas híbridas  $F_1$  são procuradas. Os híbridos  $F_1$  preferidos são mais vigorosos que os seus progenitores puros. Este vigor híbrido, ou heterose, pode manifestar-se em muitas características poligénicas, incluindo um aumento do crescimento vegetativo e um aumento do rendimento.

O desenvolvimento de um híbrido de milho num programa de reprodução de plantas de milho envolve três etapas: (1) a seleção de plantas de várias *pools* de germoplasma para cruzamentos reprodutores iniciais; (2) a autopolinização das plantas selecionadas a partir dos cruzamentos reprodutores para várias gerações para produzir uma série de linhas puras, as quais, embora diferentes umas das outras, se reproduzem de forma verdadeira e são altamente uniformes; e (3) o cruzamento das linhas puras selecionadas

com diferentes linhas puras para produzir a descendência híbrida ( $F_1$ ). Durante o processo de endogamia no milho, o vigor das linhas diminui. O vigor é restaurado quando duas linhas puras diferentes são cruzadas para produzirem a descendência híbrida ( $F_1$ ). Uma consequência importante da homoziguidade e homogeneidade das linhas puras é que o híbrido entre um par definido de linhagens será sempre o mesmo. Uma vez identificadas as linhagens que dão um híbrido superior, a semente híbrida pode ser reproduzida indefinidamente desde que a homogeneidade dos progenitores puros seja mantida. Muito do vigor híbrido exibido pelos híbridos  $F_1$  é perdido na geração seguinte ( $F_2$ ). Consequentemente, a semente de híbridos não é usada para armazenamento de plantio.

A produção de sementes híbridas requer a eliminação ou inativação do pólen produzido pelo progenitor feminino. A remoção incompleta ou inativação do pólen proporciona o potencial para autopolinização. Esta semente inadvertidamente autopolinizada pode ser colhida sem intenção e empacotada com a semente híbrida.

Uma vez plantada a semente, é possível identificar e selecionar estas plantas autopolinizadas. Estas plantas autopolinizadas serão geneticamente equivalentes à linha pura feminina usada para produzir o híbrido.

Tal como é prontamente evidente para um perito na técnica, os modos acima expostos são apenas alguns dos vários modos pelos quais a linhagem da presente invenção pode ser obtida por aqueles que procuram a introgressão do genótipo transgênico da presente invenção em outras linhas de milho. Estão disponíveis outros meios, e os exemplos acima são meramente ilustrativos.

## EXEMPLOS

A invenção será ainda descrita fazendo-se referência aos exemplos detalhados que se seguem. Estes exemplos são fornecidos para finalidades de ilustração apenas, e não se destinam a ser limitativos, salvo especificação em contrário. As técnicas-padrão de DNA recombinante e clonagem molecular usadas no presente documento são bem conhecidas na técnica e são descritas por Ausubel (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (1994); J. Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>a</sup> Ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001); e por T.J. Silhavy, M. L. Berman, e L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984).

### Exemplo 1. Transformação e Seleção do Evento MIR604

O evento MIR604 foi produzido por transformação mediada pela Agrobactéria da linha de milho puro (*Zea mays*) A188. O calo embriogénico do Tipo I foi transformado essencialmente tal como descrito em Negrotto *et al.* (*Plant Cell Reports* 19: 798-803, 2000), usando um fragmento de DNA do plasmídeo pZM26 (Figura 1). O pZM26 contém uma sequência de nucleótidos que compreende cassetes de expressão em tandem. A primeira cassette de expressão é composta por uma sequência promotora MTL (Patente US 6,018,099) operacionalmente ligada a uma sequência codificadora do *cry3A055*, ainda operacionalmente ligada a uma sequência de terminação da transcrição e de poliadenilação na extremidade 3' da nopalina sintase. A segunda cassette de

expressão é composta por um promotor da ubiquitina do milho (ZmUbiInt) (Christensen *et al.* 1992 PMB 18: 675) operacionalmente ligado a uma sequência de codificação do *pmi*, ainda operacionalmente ligado a uma sequência de terminação da transcrição e de poliadenilação na extremidade 3' da nopalina sintase.

Os embriões imaturos foram removidos de espigas com 8 a 12 dias e lavados com meio fresco na preparação para a transformação. Os embriões foram misturados com a suspensão de células de *Agrobactérias* que possuem o vetor de transformação pZM26, agitados durante 30 segundos, e deixados a incubar durante mais 5 minutos. O excesso de solução de *Agrobactérias* foi aspirado e os embriões de seguida movidos para placas contendo um meio de cultura não seletivo. Os embriões foram cocultivados com as *Agrobactérias* restantes a 22 °C durante 2-3 dias no escuro. Os embriões foram transferidos para meio de cultura complementado com ticarcilina (100 mg/mL) e nitrato de prata (1,6 mg/L), e incubados no escuro durante 10 dias. Os embriões que produzem calos embriogénicos foram transferidos para meio de cultura celular contendo manose.

Testaram-se brotos regenerados por análise TAQMAN<sup>®</sup> PCR (ver Exemplo 2) quanto à presença tanto do gene *pmi* como *cry3A055*, bem como quanto à ausência do gene espectinomicina (*spec*) resistente a antibióticos. As plantas positivas para ambos os transgenes, e negativas para o gene *spec*, foram transferidas para a estufa para propagação adicional. Os eventos positivos foram identificados e triados usando bioensaios de insetos contra a lagarta da raiz do milho. Os eventos inseticidas foram caracterizados quanto ao número de cópias por análise

TAQMAN®. O MIR604 foi escolhido para análise adicional baseado em ter uma única cópia dos transgenes, boa expressão proteica tal como identificada por ELISA, e boa atividade inseticida contra a lagarta da raiz do milho.

A população T<sub>0</sub> do MIR604 foi retrocruzada com a linha de milho puro CG00526, criando a população T<sub>1</sub>. As plantas T<sub>1</sub> foram autopolinizadas para criar a geração T<sub>2</sub>, e este processo foi repetido para criar uma geração T<sub>3</sub>. Empregou-se o teste da descendência das plantas T<sub>3</sub> para identificar as famílias homozigóticas (convertidas). A linhagem CG00526 convertida do MIR6004 foi cruzada com outras linhas puras de elite para criar híbridos usados em estudos adicionais.

#### Exemplo 2. Deteção do MIR604 por PCR TAQMAN®

A análise TAQMAN® foi essencialmente levada a cabo tal como descrita no artigo Ingham *et al.* (Biotechniques, 31:132-140, 2001). Resumidamente, o DNA genómico foi isolado a partir de folhas de plantas de milho transgénico e não transgénico usando o *kit* de Extração de DNA Genómico Puregene® (Gentra Systems, Minneapolis, MN), essencialmente de acordo com as instruções do fabricante, exceto que todas as etapas foram conduzidas em placas de 96 poços de 1,2 mL. A pelota seca de DNA foi novamente suspensa em tampão TE (Tris-HCl 10 Mm, pH 8,0, EDTA 1 mM).

As reações PCR TAQMAN® foram levadas a cabo em placas de 96 poços. Para o controlo do gene do milho endógeno, foram concebidos iniciadores e sondas específicas do gene álcool desidrogenase (*adh*) *Zea mays* (nº de acesso ao Genbank AF044295). Será reconhecido pelo perito que podem ser usados outros genes do milho como controlos endógenos. As

reações foram multiplexadas para amplificarem em simultâneo o *cry3A055* e o *adh*, ou o *pmi* e o *adh*. Para cada amostra, gerou-se uma mistura principal combinando 20 µL de DNA genómico extraído com 35 µL de 2x Mistura Principal para PCR Universal TAQMAN (Applied Biosystems) complementada com iniciadores, de modo a se obter uma concentração final de 900 nM em cada um, sondas a uma concentração final de 100 nM cada uma, e água de modo a perfazer um volume final de 70 µL. Esta mistura foi distribuída em três réplicas de 20 µL cada, em placas de amplificação de 96 cavidades e seladas com película de selagem a quente ópticamente transparente (Marsh Bio Products). A PCR foi efetuada num instrumento ABI Prism 7700 usando os parâmetros de amplificação que se seguem: 2 min a 50 °C e 10 min a 95 °C, seguidos por 35 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C.

Os resultados da análise TAQMAN® demonstraram que o evento MIR604 tinha uma cópia do gene *cry3A055* e uma cópia do gene *pmi*.

Exemplos de combinações de sequências de iniciadores/sondas adequadas que foram usadas são:

Nome do Iniciador	Sequência do Iniciador	SEQ ID NO:
direto Cry3A055	5'-TACGAGAGCTGGGTGAACTTCA-3'	SEQ ID NO: 47
reverso Cry3A055	5'-CGATCAGGTCCAGCACGG-3'	SEQ ID NO: 48
sonda Cry3A055	5'-CCGCTACCGCCGCGAGATGA-3'	SEQ ID NO: 49
	(marcador 5' = FAM, marcador 3' = TAMRA)	
direto PMI	5'-CCGGGTGAATCAGCGTTT-3'	SEQ ID NO: 50
reverso PMI	5'-GCCGTGGCCTTTGACAGT-3'	SEQ ID NO: 51
sonda PMI	5'-TGCCGCAACGAATCACCGG-3'	SEQ ID NO: 52
	(marcador 5' = FAM, marcador 3' = TAMRA)	

Nome do Iniciador	Sequência do Iniciador	SEQ ID NO:
direto ZmADH-267	5'-GAACGTGTGTTGGGTTGCAT-3'	SEQ ID NO: 53
reverso ZmADH-337	5'-TCCAGCAATCCTTGACCTT-3'	SEQ ID NO: 54
sonda ZmADH-316	5'-TGCAGCCTAACCATGCGCAGGGTA-3'	SEQ ID NO: 55
	(marcador 5' = TET, marcador 3' = TAMRA)	

### Exemplo 3. Deteção do MIR604 por *Southern Blot*

O DNA genómico usado para análise *southern* foi isolado a partir de tecidos de folhas reunidas de dez plantas que representam a sexta geração do retrocruzamento (BC6) do MIR604 usando essencialmente o método do artigo Thomas *et al.* (Theor. Appl. Genet. 86:173-180, 1993). Todas as plantas usadas para isolamento do DNA foram individualmente analisadas usando PCR TAQMAN® (tal como descrita no Exemplo 2) para confirmar a presença de uma única cópia do gene *cry3A055* e do gene *pmi*. Para os controlos segregantes negativos, o DNA foi isolado a partir de tecidos de folhas reunidos de cinco plantas que representam a geração BC4 do evento MIR604. Estas plantas segregantes negativas foram individualmente analisadas usando PCR TAQMAN e os ensaios deram negativos quanto à presença do gene *cry3A055* e do gene *pmi*, mas foram, tal como esperado, positivos para o ensaio do controlo interno, o gene do milho endógeno *adh*.

A análise *Southern* foi levada a cabo usando técnicas convencionais de biologia molecular. O DNA genómico (7,5 µg) foi digerido com a enzima de restrição *KpnI*, que tem um único sítio de reconhecimento na inserção T-DNA do MIR604 do plasmídeo pZM26 (Figura 1). Esta aproximação permite a determinação do número de cópias dos elementos, correspondentes à sonda específica usada para cada

*Southern*, que foram incorporadas no MIR604. Isto resulta numa banda de hibridização por cópia do elemento presente no MIR604. Depois da eletroforese em gel de agarose e transferência alcalina para uma membrana Nytran®, as hibridizações foram levadas a cabo usando sondas geradas por PCR de comprimento total, específicas do elemento. A sonda usada nos *Southern blots* para o *cry3A055* e o *pmi* compreende as sequências de nucleótidos estabelecida nas SEQ ID NO: 58 e SEQ ID NO: 61, respetivamente. As sondas foram marcadas com  $^{32}\text{P}$  via iniciação aleatória usando o sistema Rediprime™ II (Amersham Biosciences, N° de Cat. RPN1633).

Foram usadas as condições de hibridização de alta estrringência que se seguem: adicionam-se 1-2 milhões de cpm/mL a PerfectHyb (Sigma) complementado com DNA de timo de vitela a 100 µg/mL (Invitrogen), pré-aquecido a 65 °C. A pré-hibridização toma lugar na mesma solução que acima, à mesma temperatura, de um dia para o outro, ou durante pelo menos uma hora. A hibridização foi levada a cabo a 65 °C durante 3 horas, seguida de lavagem 2X com 2X SSC, SDS a 0,1% durante 20 minutos a 65 °C e 2X com 0,1X SSC, SDS a 0,1% durante 20 minutos a 65 °C.

Incluídas em cada *Southern*, estavam três amostras de controlo: (1) DNA de um segregante negativo (não transformado) usado para identificar quaisquer sequências endógenas de *Zea mays* que se possam hibridizar por cruzamento com a sonda específica para o elemento; (2) DNA de um segregante negativo no qual é introduzida uma quantidade de pZM26 digerido com *KpnI* que é igual a um número de cópia baseado no comprimento da sonda, para demonstrar a sensibilidade da experiência na deteção da

cópia única de um gene no genoma do *Zea mays*; e (3) plasmídeo pZM26 digerido com *KpnI* que é igual a um número de cópia baseado no comprimento da sonda, como controle positivo para a hibridização, bem como para demonstrar a sensibilidade da experiência.

Os dados de hibridização fornecem evidência confirmatória para apoiar a análise PCR TAQMAN® de que o MIR604 contém uma única cópia dos genes *cry3A055* e *pmi*, e de que o MIR604 não contém nenhuma das sequências estruturais do vetor presente no pZM26. Tal como esperado para ambas as sondas *cry3A055* e *pmi*, a digestão com *KpnI* resultou numa única banda de hibridização de tamanho correto, demonstrando que está presente uma única cópia de cada gene no evento MIR604. Para além disso, para a sonda estrutural, uma falta de hibridização demonstra a ausência de quaisquer sequências estruturais do vetor pZM26a a ser incorporadas no MIR604 durante o processo de transformação.

#### Exemplo 4. Sequenciação da Inserção de T-DNA

A sequência de nucleótidos da inserção completa de DNA transgênico presente no evento MIR604 foi determinada para demonstrar a integridade global da inserção, a contiguidade dos elementos funcionais, e para detetar quaisquer modificações de pares de bases individuais. A inserção MIR604 foi amplificada por PCR a partir de DNA derivado da geração BC5 como dois fragmentos individuais sobrepostos. Cada fragmento foi amplificado usando um iniciador de polinucleótidos homólogo de sequências genómicas da planta que flanqueiam a inserção MIR604 e um iniciador de polinucleótidos homólogo do gene *cry3A055*. Para gerar o

fragmento 5', combinou-se um primeiro iniciador de polinucleótidos homólogo da sequência de flanqueamento 5', 5'SI (SEQ ID NO: 15), com um segundo iniciador de polinucleótidos homólogo do DNA inserido no gene cry3A055, 5'AS1 (SEQ ID NO: 28). Para gerar o fragmento 3', combinou-se um primeiro iniciador de polinucleótidos homólogo da sequência de flanqueamento 3', 9268AS (SEQ ID NO: 45), com um segundo iniciador de polinucleótidos homólogo do DNA inserido no gene cry3A055, 5161S (SEQ ID NO: 27).

A amplificação por PCR foi levada a cabo usando o sistema Expand High Fidelity PCR (Roche, N° de Cat. 1732650) e os parâmetros de amplificação que se seguem: 2 min a 94 °C para 1 ciclo, seguidos de 10 ciclos de 15 s a 94 °C, 30 s a 55-65 °C e 5 min a 68 °C, seguidos de 20 ciclos de 15 s a 94 °C, 30 s a 55-65 °C, e 5 min + 5 s/ciclo de 72 °C, seguidos de 1 ciclo de 7 min a 72 °C.

O amplicão resultante da amplificação por PCR usando a SEQ ID NO: 15 e a SEQ ID NO: 28 compreendia a sequência de junção 5' (SEQ ID NO: 1). O amplicão resultante da amplificação por PCR usando a SEQ ID NO: 45 e a SEQ ID NO: 27 compreendia a sequência de junção 3' (SEQ ID NO: 2). Cada fragmento de sequenciação foi individualmente clonado no vetor pCR®-XL-TOPO (Invitrogen, N° de Cat. K4700-20), e foram identificados e sequenciados três clones separados para cada fragmento. A sequenciação foi levada a cabo usando o analisador ABI3730XL, utilizando a química do ABI BigDye® 1.1 ou Big Dye 3.1 dGTP (para modelos ricos em GC). A análise de sequências foi efetuada usando o pacote Phred, Phrap, e Consed da Universidade de Washington, e foi levada a cabo com uma taxa de erro inferior a 1 em 10.000 bases (Ewing e Green, 1998). A sequência de consenso final foi

determinada combinando os dados das sequências dos seis clones individuais (três para cada fragmento de sequenciação) para gerar uma sequência de consenso da inserção MIR604. Para validar adicionalmente quaisquer discrepâncias de pares de bases individuais entre a inserção MIR604 e o plasmídeo pZM26, amplificaram-se produtos de PCR pequenos (com aproximadamente 300-500 bp) específicos de quaisquer regiões em que tenha sido verificada uma discrepância de pares de bases na sequência de consenso inicial, usando a mesma metodologia acima. Para todas as discrepâncias putativas de pares de bases na inserção MIR604, a sequenciação do produto da PCR direta resultou em picos únicos bem definidos para todos os pares de bases em questão, indicando que estas discrepâncias estão provavelmente presentes na inserção MIR604. O alinhamento foi efetuado usando o programa ClustalW, com os seguintes parâmetros: matriz de pontuação blosum 55, penalidade de abertura de lacunas 15, penalidade de extensão de lacunas 6,66 (Thompson *et al.*, 1994, *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680).

Os dados da sequência de consenso para a inserção de T-DNA do MIR604 demonstram que a integridade global da inserção e a contiguidade dos elementos funcionais na inserção tal como se pretendia em pZM26 foram mantidas. A análise de sequências revelou que ocorreu alguma truncagem nas extremidades da fronteira direita (RB) (SEQ ID NO: 57) e fronteira esquerda (LB) (SEQ ID NO: 62) da inserção de T-DNA durante o processo de transformação que resultou no evento MIR604. A parte RB da inserção de T-DNA foi truncada por 44 bp e a extremidade LB da inserção de T-DNA foi truncada por 43 bp. Estas supressões não têm qualquer efeito na eficácia da inserção de T-DNA e este fenômeno foi anteriormente observado na transformação de *Agrobacterias*

(Tinland & Hohn, 1995. *Genetic Engineering*, 17: 209-229). Adicionalmente, foram notadas modificações em três pares de bases na inserção de T-DNA do MIR604. Ocorreu uma discrepância no promotor MTL, uma região regulatória que não codifica uma proteína. As duas discrepâncias restantes ocorreram na sequência de codificação do *pmi* e resultaram em modificações em dois aminoácidos; a valina na posição 61 foi substituída por alanina (V61A), e a glutamina na posição 210 foi substituída por histidina (Q210H). A alanina e a valina são ambos aminoácidos alifáticos que resultam numa substituição conservativa. A substituição da glutamina por histidina resulta na substituição de um resíduo ácido por um resíduo básico.

#### Exemplo 5. Análise da Sequência de DNA de Flanqueamento

A sequência de DNA genômico do milho que flanqueia o DNA heterólogo inserido no genoma da planta de milho do evento MIR604 foi obtida usando a Tecnologia OmniPlex™, essencialmente como descrita no artigo Kamberov *et al* (*Proceedings of SPIE, Tools for Molecular Analysis and High-Throughput Screening*, 4626:1-12, 2002).

As sequências de flanqueamento 5' e 3' e as sequências de junção foram confirmadas usando procedimentos PCR padrão. As sequências de flanqueamento 5' e de junção foram confirmadas usando um primeiro iniciador de polinucleótidos estabelecido nas SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 ou na SEQ ID NO: 13, combinado com um segundo iniciador de polinucleótidos estabelecido na SEQ ID NO: 16 ou na SEQ ID NO: 17. As sequências de flanqueamento 3' e de junção foram confirmadas usando um primeiro iniciador de polinucleótidos

estabelecido na SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 ou na SEQ ID NO: 44, combinado com um segundo iniciador de polinucleótidos estabelecido na SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 ou na SEQ ID NO: 36. Será reconhecido pelo especialista que podem ser utilizadas outras sequências de iniciadores para confirmar as sequências de flanqueamento e junção.

Verificou-se que a inserção MIR604 é flanqueada na fronteira direita (sequência de flanqueamento 5') pela sequência genómica do milho apresentada na SEQ ID NO: 5 e flanqueada na fronteira esquerda (sequência de flanqueamento 3') pela sequência genómica do milho apresentada na SEQ ID NO: 6. A sequência de junção 5' está estabelecida na SEQ ID NO: 1. A sequência de junção 3' está estabelecida na SEQ ID NO: 2.

#### Exemplo 6. Deteção da proteína MIR604 por ELISA

Para caracterizar o intervalo de expressão das proteínas Cry3A055 (o princípio inseticida ativo) e fosfomanose isomerase (PMI) (o marcador selecionável) em plantas MIR604, as concentrações da proteína Cry3A055 e da PMI foram determinadas por ELISA em vários tecidos de plantas e plantas completas em quatro fases do crescimento (verticilo, antese, maturidade da semente e senescência) em dois híbridos (MIR604-B e MIR604-C) e numa planta pura (MIR604-A). Os híbridos eram homozigóticos para os transgenes no evento MIR604, enquanto que a linha pura era homozigótica para os transgenes.

As plantas completas e partes individuais (exceto o pólen) foram reduzidas a um pó fino por processamento usando um moinho de café, um misturador, um moedor Grindomix™ (Brinkmann Instruments; Westbury, NY, USA), um almofariz com um pilão ou um moinho, ou uma combinação destes dispositivos. Todo o processamento foi efetuado na presença de gelo seco ou azoto líquido. As amostras foram bem misturadas para assegurar a homogeneidade. A amostra de tecido da planta completa, ou uma subamostra representativa, foi retida para análise, permitindo um tamanho de amostra suficiente para armazenamento de arquivos de amostras de tecidos de reserva da planta. Foi determinada a percentagem de peso seco de cada amostra e as amostras processadas foram armazenadas a cerca de -80 °C até à liofilização.

Extraíram-se amostras de tecido fresco (exceto pólen e silagem) e de planta completa. Para cada amostra analisada, pesou-se uma alíquota de 1,0 g de material fresco sob a forma de pó para dentro de um tubo de polipropileno de 15 mL, suspendeu-se em 3 mL de tampão de extração [CAPS 50 mM, NaCl 0,1 M, EDTA 2 mM, ditiotreitól 1 mM, fluoreto de 4-(1-aminoetil)benzenossulfonilo·HCl 1 mM, leupeptina 1 mM, pH 10], e extraiu-se usando um homogeneizador Autogizer® (Tomtek; Hamden, CT, EUA). Após centrifugação durante 15 min a 10.000 x g a 4 °C, usou-se o sobrenadante para análise de Cry3A055 e PMI por ELISA. Depois de tratamento com iodoacetamida, tal como descrito por Hill e Straka (1988), quantificou-se a proteína total nos extratos usando o Reagente de Ensaio de Proteínas BCA TN (Pierce; Rockford, IL, USA).

Prepararam-se extratos de pólen por suspensão do pólen 1:30 (p/v) em tampão de extração. Após 30 min. em gelo, as suspensões de pólen foram destruídas por meio de três passagens através de uma célula de pressão francesa a cerca de 15.000 psi, seguidas de centrifugação a 14.000 x g durante 5 min a 4 °C. As análises da Cry3A055 e da PMI por ELISA foram efetuadas nos sobrenadantes tal como se descreve abaixo. A proteína total foi quantificada tal como se descreve acima.

Prepararam-se extratos de silagem por suspensão da silagem 1:25 (p/v) em 2X tampão de extração. Depois de 30 min. em gelo, as suspensões de silagem foram extraídas usando um Homogeneizador Brinkmann Polytron® (Brinkmann; Westbury, NY, EUA). Após centrifugação durante 15 min. a 10.000 x g a 4 °C, usou-se o sobrenadante para análise da Cry3A055 e PMI por ELISA. A proteína total foi quantificada tal como se descreve acima.

#### Quantificação da Cry3A055

Os extratos preparados como descritos acima foram analisados quantitativamente quanto à proteína Cry3A055 por ELISA (Tijssen, 1985) usando anticorpos policlonais anti-Cry3A055 de coelho purificados por imunoafinidade e anticorpos policlonais anti-Btt (Cry3A nativa de *Bacillus thuringiensis*, subespécie *tenebrionis*) de cabra purificados por imunoafinidade. O limite inferior de quantificação da ELISA de dupla sanduíche foi estimado com base na concentração mais baixa de proteína de referência pura que se encontra na parte linear da curva-padrão, no volume máximo de um extrato de controle que pode ser analisado sem

interferência do ruído de fundo, e no peso correspondente da amostra que a alíquota representa.

Foram detetados níveis quantificáveis de proteína Cry3A055 em todos os tecidos de plantas derivados do MIR604 analisados, exceto no pólen. Na maior parte dos casos, os resultados estão apresentados como as médias das cinco repetições das amostras de tecidos. Para a silagem, foi analisada uma amostra; por conseguinte, não se pode calcular qualquer média. Os níveis das amostras de controlo ficaram abaixo do limite de quantificação para todas as fases e tecidos.

Através de todas as fases de crescimento, os níveis médios de Cry3A055 medidos nas folhas, raízes e plantas completas variaram de cerca de 3 a 23  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco (4 - 94  $\mu\text{g/g}$  de peso seco), cerca de 2 a 14  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco (7 - 62  $\mu\text{g/g}$  de peso seco), e cerca de 0,9 a 11  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco (3 - 28  $\mu\text{g/g}$  de peso seco), respetivamente. Os níveis médios de Cry3A055 medidos nos grãos na maturidade da semente e senescência variaram de cerca de 0,6 a 1,4  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco (0,8 - 2,0  $\mu\text{g/g}$  de peso seco). Os níveis médios de Cry3A055 medidos nos tecidos das sedas na antese ficaram abaixo do limite inferior de quantificação (LOQ), <0,1  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco (<1,0  $\mu\text{g/g}$  de peso seco). Os níveis médios de Cry3A055 medidos nos tecidos das sedas na maturidade da semente variaram de cerca de 0,6 a 1,9  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco (1 - 3  $\mu\text{g/g}$  de peso seco). Não foi detetada qualquer proteína Cry3A055 no pólen quer de MIR604-A puro, quer de híbridos MIR604-B e MIR604-C [limite de deteção (LOD) = 0,07  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco, 0,15  $\mu\text{g/g}$  de peso seco].

Os níveis de Cry3A055 foram em geral semelhantes entre híbridos para cada tipo de tecido em cada ponto do tempo. Para a linha pura, a expressão da proteína Cry3A055 foi em geral superior à dos híbridos nas folhas, raízes e plantas completas nas fases de verticilo e antese, e nas raízes na maturidade da semente. Os níveis de Cry3A055 medidos em tecidos de silagem foram em média de 2,5 µg/g de peso fresco (7,3 µg/g de peso seco) aos 15, 29 e 75 dias. Em comparação, o nível de Cry3A055 medido no material de planta picada antes da ensilagem (Dia 0 pré-ensilagem) foi de cerca de 8 µg/g de peso fresco (20 µg/g de peso seco).

#### Quantificação da PMI

Os extratos preparados como descritos acima foram analisados quantitativamente quanto à PMI por ELISA (Tjissen, 1985) usando anticorpos de coelho policlonais purificados com Proteína A e anticorpos de cabra policlonais purificados por imunoafinidade, específicos para a PMI. O limite inferior de quantificação da ELISA de dupla sanduíche foi estimado com base na concentração mais baixa de proteína de referência pura que se encontra na parte linear da curva-padrão, no volume máximo de um extrato de controlo que pode ser analisado sem interferência do ruído de fundo, e no peso correspondente da amostra que a alíquota representa.

A proteína PMI foi detetada na maior parte dos tecidos de plantas derivadas do MIR604 analisados, embora em baixos níveis. Na maioria dos casos, os resultados estão apresentados como as médias das cinco repetições das amostras de tecidos. Para a silagem, foi analisada uma réplica; por conseguinte, não se pode calcular qualquer

média. Os níveis das amostras de controlo ficaram abaixo do limite de quantificação para todas as fases e tecidos.

Ao longo de todas as fases da planta, os níveis médios de PMI medidos nas folhas, raízes e plantas completas variaram de não detetáveis (ND) a cerca de 0,4 µg/g de peso fresco (ND - 2,1 µg/g de peso seco), abaixo do LOQ (<0,03 µg/g de peso fresco) a cerca de 0,2 µg/g de peso fresco (<0,1 - 1,0 µg/g de peso seco), e abaixo do LOQ (<0,02 µg/g de peso fresco) a cerca de 0,3 µg/g de peso fresco (<0,04 - 2 µg/g de peso seco), respetivamente. Os níveis médios de PMI medidos nos grãos na maturidade da semente e senescência variaram de abaixo do LOQ (<0,06 µg/g de peso fresco) a cerca de 0,4 µg/g de peso fresco (<0,07 - 0,5 µg/g de peso seco). Os níveis médios de PMI medidos em tecidos das sedas na antese e na maturidade da semente variaram de abaixo do LOQ (<0,1 µg/g de peso fresco) a cerca de 0,8 µg/g de peso fresco (<0,2 - 6,8 µg/g de peso seco). A PMI no pólen variou de cerca de 1,9 a 2,6 µg/g de peso fresco (3,9 - 5,2 µg/g de peso seco).

Os níveis de PMI foram em geral semelhantes entre os genótipos puros e híbridos para cada tipo de tecido em cada ponto do tempo. A PMI não foi detetável na silagem em nenhum dos três tempos de amostragem (dia 15, 29 e 75), enquanto que o nível medido no material de plantas picadas antes da ensilagem (Dia 0 pré-ensilagem) foi de cerca de 0,3 µg/g de peso fresco (0,7 µg/g peso seco).

Níveis totais estimados de proteína Cry3A055 por acre e por hectare

Para a linha pura (MIR604-A) e ambos os híbridos (MIR604-B e MIR604-C), as plantas atingiram a sua biomassa mais

elevada na maturidade da semente. As plantas alcançaram também os seus níveis médios estimados mais elevados de Cry3A055 numa base por acre (e por hectare) na maturidade da semente, e estimou-se conterem cerca de 78, 141 e 240 g de Cry3A055/acre (193, 348 e 592 g/hectare) para o MIR604-A, MIR604-B e o MIR604-C, respetivamente. Durante a estação do crescimento e em todos os genótipos, as estimativas da Cry3A055 em plantas derivadas do MIR604 variaram de níveis médios de cerca de 8 g de Cry3A055/acre (21 g de Cry3A055/hectare) na fase da senescência a cerca de 240 g de Cry3A055/acre (592 g de Cry3A055/hectare) na maturidade da semente, assumindo uma densidade da plantação de 26.500 plantas por acre (65.500 plantas/hectare).

#### Exemplo 7. Eficácia de Campo do MIR604

##### Lagarta da Raiz do Milho Ocidental e do Norte

As plantas MIR604 foram testadas quanto à eficácia contra a lagarta da raiz do milho ocidental e do norte em 12 localizações nos Estados Unidos. O MIR604 foi testado com e sem a adição do tratamento das sementes com o inseticida Crusier®. Os grupos de controlo consistiram em sementes tratadas com duas proporções diferentes de Cruiser® e um controlo não tratado. Os tratamentos consistiram em quatro repetições de duas filas de 17,5-20 pés espaçadas de 30" no centro, concebidas num bloco completo aleatório. Escolheram-se dez plantas por tratamento aleatoriamente e avaliaram-se quanto à eficácia usando uma escala de 0 a 3, em que 0 = Nenhum dano por alimentação (classificação mais baixa que pode ser dada); 1 = Um nódulo (círculo de raízes), ou o equivalente a um nódulo inteiro, comido em aproximadamente duas polegadas do talo (linha do solo no 7°

nódulo); 2 = Dois nódulos completos comidos; 3 = Três ou mais nódulos comidos (classificação máxima que pode ser dada). Os danos entre nódulos completos comidos foram anotados como a percentagem do nódulo em falta, isto é, 1,50 = 1 ½ nódulos comidos, 0,25 = ¼ de nódulo comido.

Os resultados, apresentados na Tabela 1, demonstram que as raízes das duas linhas irmãs do MIR604, 3-11 e 3-12, sofreram significativamente menos danos por alimentação do que as raízes com tratamento com Cruiser® ou as raízes do controlo não tratado. As linhas MIR604-3-11 e MIR604-3-12 tiveram classificações de danos das raízes de 0,44 e 0,42, respetivamente, em comparação com 0,25 e 1,25 mgA/Semente para os tratamentos com Cruiser®, que tiveram classificações de danos de 1,6 e 0,9, respetivamente, e a linha de controlo com uma classificação de danos de 2,14. Houve uma tendência no sentido de classificações de danos nas raízes mais baixos nas plantas MIR604 cujas sementes foram tratadas com Cruiser®, sugerindo que o Crusier® aumentou a proteína Cry3A055 ou que houve uma possível sinergia entre o Crusier® e a Cry3A055. Isto foi particularmente evidente nos tratamentos das sementes a 1,0 e 1,25 mgA/MIR604, com classificações dos danos nas raízes de 0,33 e 0,29, respetivamente.

Tabela 1. Eficácia do MIR604 com e sem tratamento da semente com Crusier®

Linha de Milho	Tratamento com Cruiser® (mgA/Semente)	Classificação dos Danos nas Raízes (Escala CRW 0-3)
MIR604-3-11	0	0,44
MIR604-3-12	0	0,42

Linha de Milho	Tratamento com Cruiser® (mgA/Semente)	Classificação dos Danos nas Raízes (Escala CRW 0-3)
MIR604	0,25	0,43
MIR604	0,50	0,39
MIR604	1,0	0,33
MIR604	1,25	0,29
Híbrido de Controlo	0,25	1,60
Híbrido de Controlo	1,25	0,99
Híbrido de Controlo	0	2,14

A eficácia do MIR604 foi comparada com padrões comerciais de inseticida em grânulos aplicados nos sulcos. A conceção experimental foi tal como descrita acima. Os resultados na Tabela 2 demonstram que a eficácia do MIR604 foi comparável aos padrões comerciais na proteção das plantas contra os danos por alimentação da lagarta da raiz do milho.

Tabela 2. Comparação da eficácia do MIR604 com inseticidas comerciais aplicados nos sulcos.

Tratamento	Classificação dos Danos nas Raízes (Escala CRW 0-3)
MIR604	0,43
Force® 3G	0,44
Aztec® 6.7G	0,32
Lorsban® 15 G	0,75
Controlo não tratado	2,14

Lagarta da Raiz do Milho Mexicana

As plantas MIR604 foram avaliadas quanto à resistência à lagarta da raiz do milho mexicana em duas localizações no Texas. A concepção experimental foi essencialmente a mesma que descrita acima.

Os resultados apresentados na Tabela 3 demonstram que ambas as linhas-irmãs MIR604 sofreram menos danos por alimentação do que os controlos não tratados. Houve uma resposta positiva para o controlo da lagarta da raiz do milho mexicano quando se adicionou Cruiser® à semente MIR604. Foi evidente uma resposta clara à proporção de inseticida. Os resultados na Tabela 4 demonstram que a eficácia do MIR604 foi comparável aos padrões comerciais na proteção das plantas contra os danos por alimentação da lagarta da raiz do milho mexicana.

Tabela 3. Eficácia do MIR604, com e sem tratamento das sementes com Cruiser®, contra a lagarta da raiz do milho mexicana.

Tratamento	Proporção de Cruiser® (mgA/Semente)	Classificação dos Danos nas Raízes (Escala CRW 0-3)
MIR604-3-11	0	1,14
	0,125	0,19
	0,25	0,18
	0,50	0,09
	1,25	0,02
MIR604-3-12	0	0,68
	0,125	0,46
	0,25	0,18
	0,50	0,21
	1,25	0,04
Híbrido de Controlo	0,125	1,59
	1,25	0,71
	0	2,76

Tabela 4. Eficácia do MIR604 comparada com inseticidas comerciais aplicados nos sulcos contra a lagarta da raiz do milho mexicana.

Tratamento	Classificação dos Danos nas Raízes (Escala CRW 0-3)
MIR604	0,68
Force® 3G	0,66
Aztec® 6.7G	0,88
Lorsban® 15 G	0,81
Controlo não tratado	2,76

Embora a invenção precedente tenha sido descrita em detalhe a título de ilustração e exemplo para fins de clareza de compreensão, será óbvio que certas alterações e modificações podem ser praticadas dentro do âmbito da presente invenção.

Formas de realização da Invenção:

Numa primeira forma de realização, a invenção refere-se a uma molécula de ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de nucleótidos que compreende pelo menos uma sequência de junção do evento MIR604 selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, e sequências complementares das mesmas.

A forma de realização 2 refere-se a uma molécula de ácido nucleico isolado compreendendo pelo menos 10 nucleótidos contíguos da sequência de DNA de inserção heteróloga do evento de milho MIR604 e pelo menos 10 nucleótidos contíguos de DNA do genoma de plantas de milho que flanqueiam a referida sequência de DNA de inserção do evento de milho MIR604.

A forma de realização 3 refere-se à molécula de ácido nucleico isolado da forma de realização 2, compreendendo pelo menos 20 nucleótidos contíguos da sequência de DNA de inserção heteróloga do evento de milho MIR604 e pelo menos 20 nucleótidos contíguos de DNA do genoma de plantas de milho que flanqueiam a referida sequência de DNA de inserção do evento de milho MIR604.

A forma de realização 4 refere-se à molécula de ácido nucleico isolado da forma de realização 2, compreendendo

pelo menos 50 nucleótidos contíguos da sequência de DNA de inserção heteróloga do evento de milho MIR604 e pelo menos 50 nucleótidos contíguos de DNA do genoma de plantas de milho que flanqueiam a referida sequência de DNA de inserção do evento de milho MIR604.

A forma de realização 5 refere-se a uma molécula de ácido nucleico isolado compreendendo uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, e sequências complementares das mesmas.

A forma de realização 6 refere-se a um ácido nucleico isolado que liga uma molécula de DNA heterólogo ao genoma da planta do milho, no evento de milho MIR604 que compreende uma sequência de cerca de 11 a cerca de 20 nucleótidos contíguos selecionados entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, e sequências complementares das mesmas.

A forma de realização 7 refere-se a um amplicão compreendendo a molécula de ácido nucleico de qualquer uma das formas de realização 1 a 6.

A forma de realização 8 refere-se a uma sequência de iniciador de polinucleótidos para detetar o DNA do evento de milho MIR604 numa amostra, compreendendo pelo menos 10 nucleótidos contíguos da posição 1-801 como se estabelece na SEQ ID NO: 3, ou sequências complementares da mesma.

A forma de realização 9 refere-se ao iniciador de acordo com a forma de realização 8, que compreende uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na

SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, e sequências complementares das mesmas.

A forma de realização 10 refere-se a um iniciador de polinucleótidos compreendendo uma sequência de nucleótidos que compreende pelo menos 10 nucleótidos contíguos da posição 507-1570 como se estabelece na SEQ ID NO: 4, ou sequências complementares das mesmas.

A forma de realização 11 refere-se ao iniciador de acordo com a forma de realização 10, que compreende uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 39 a SEQ ID NO: 46, e sequências complementares das mesmas.

A forma de realização 12 refere-se a um par de iniciadores de polinucleótidos que compreende um primeiro iniciador de polinucleótido e um segundo iniciador de polinucleótidos, que funcionam conjuntamente na presença de um modelo de DNA do evento de milho MIR604 numa amostra, para produzirem um amplicão diagnóstico do evento de milho MIR604, em que a primeira sequência de iniciadores é o genoma de uma planta de milho, ou uma sequência complementar do mesmo, que flanqueia o ponto de inserção de uma sequência de DNA heterólogo inserida no genoma da planta de milho do evento de milho MIR604, e a segunda sequência de iniciadores de polinucleótidos é a sequência do DNA heterólogo, ou é uma sequência complementar da mesma, inserida no genoma da planta de milho do evento de milho MIR604.

A forma de realização 13 refere-se ao par de iniciadores de polinucleótidos de acordo com a forma de realização 12, em que o primeiro iniciador de polinucleótidos compreende pelo

menos 10 nucleótidos contíguos da posição 1-801, conforme se estabelece na SEQ ID NO: 3, ou sequências complementares da mesma.

A forma de realização 14 refere-se com o par de iniciadores de polinucleótidos de acordo com a forma de realização 13, em que o primeiro iniciador de polinucleótidos compreende uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 15, e sequências complementares das mesmas.

A forma de realização 15 refere-se ao par de iniciadores de polinucleótidos de acordo com a forma de realização 12, em que o primeiro iniciador de polinucleótidos compreende pelo menos 10 nucleótidos contíguos da posição 507-1570, conforme se estabelece na SEQ ID NO: 4, ou sequências complementares da mesma.

A forma de realização 16 refere-se ao par de iniciadores de polinucleótidos de acordo com a forma de realização 15, em que o primeiro iniciador de polinucleótidos compreende uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 39 a SEQ ID NO: 46, e sequências complementares das mesmas.

A forma de realização 17 refere-se ao par de iniciadores de polinucleótidos de acordo com a forma de realização 12, em que o segundo iniciador de polinucleótidos compreende pelo menos 10 nucleótidos contíguos da SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, ou SEQ ID NO: 63, ou sequências complementares das mesmas.

A forma de realização 18 refere-se ao par de iniciadores de polinucleótidos de acordo com a forma de realização 17, em que o segundo iniciador de polinucleótidos compreende uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 38, e sequências complementares das mesmas.

A forma de realização 19 refere-se ao par de iniciadores de polinucleótidos de acordo com a forma de realização 12, em que o primeiro iniciador de polinucleótidos se estabelece na SEQ ID NO: 15 e o segundo iniciador de polinucleótidos se estabelece na SEQ ID NO: 28.

A forma de realização 20 refere-se ao par de iniciadores de polinucleótidos de acordo com a forma de realização 12, em que o primeiro iniciador de polinucleótidos se estabelece na SEQ ID NO: 45 e o segundo iniciador de polinucleótidos se estabelece na SEQ ID NO: 27.

A forma de realização 21 refere-se a um método de deteção de uma sequência de DNA numa amostra, compreendendo:

- (a) colocar a amostra em contacto com um par de iniciadores que, quando usados numa reação de amplificação de ácido nucleico com DNA do evento de milho MIR604 produz um amplicão que é diagnóstico para o evento de milho;
- (b) realizar uma reação de amplificação de ácido nucleico, produzindo, desse modo, o amplicão; e
- (c) detetar o amplicão.

A forma de realização 22 refere-se a um método da forma de realização 21, em que o referido fragmento amplificado compreende uma sequência de nucleótidos selecionada entre o

grupo que consiste na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, e sequências complementares das mesmas.

A forma de realização 23 refere-se a um método para detetar a presença de um DNA que corresponde ao evento MIR604 numa amostra, o método compreendendo:

- (a) colocar a amostra em contacto com uma sonda que se hibridiza em condições de alta estringência com DNA genómico do evento de milho MIR604 e não se hibridiza em condições de alta estringência com o DNA de uma planta de milho de controlo;
- (b) submeter a amostra e a sonda a condições de hibridização de alta estringência; e
- (c) detetar a hibridização da sonda com o DNA.

A forma de realização 24 refere-se a um kit para a deteção da presença de ácidos nucleicos de MIR604 numa amostra biológica, o kit compreendendo, pelo menos, uma molécula de DNA que compreende um comprimento suficiente de nucleótidos contíguos que é a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, ou SEQ ID NO: 4, ou uma sequência complementar das mesmas, que funciona como um iniciador ou sonda de DNA específica para o evento de milho MIR604.

A forma de realização 25 refere-se a um método para a deteção a proteína do evento de milho MIR604 numa amostra biológica compreendendo: (a) a extração da proteína de uma amostra de tecido de evento de milho MIR604; (b) a análise da proteína extraída usando um método imunológico que compreende um anticorpo específico para a proteína inseticida ou marcadora selecionável produzida pelo evento

MIR604; e (c) a detecção da ligação do referido anticorpo à proteína inseticida ou marcadora selecionável.

A forma de realização 26 refere-se a uma planta de milho, compreendendo uma sequência de nucleótidos estabelecida na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, ou sequências complementares das mesmas.

A forma de realização 27 refere-se à planta de milho de acordo com a forma de realização 26, em que a digestão do DNA genómico da planta com a endonuclease de restrição *KpnI* resulta numa única banda de hibridização *cry3A055* usando uma sonda específica do *cry3A055* em condições de alta estringência.

A forma de realização 28 refere-se à planta de milho da forma de realização 27, em que a referida sonda compreende a sequência de nucleótidos estabelecida na SEQ ID NO: 56 ou SEQ ID NO: 59.

A forma de realização 29 refere-se à planta de milho de acordo com a forma de realização 26, em que a digestão do DNA genómico da planta com a endonuclease de restrição *KpnI* resulta numa única banda de hibridização *pmi* usando uma sonda específica para o *pmi* em condições de alta estringência.

A forma de realização 30 refere-se à planta de milho da forma de realização 29, em que a sonda compreende a sequência de nucleótidos estabelecida na SEQ ID NO: 62.

A forma de realização 31 refere-se à planta de milho de acordo com a forma de realização 26, que é derivada do evento MIR604.

A forma de realização 32 refere-se a um kit para a detecção da presença do DNA do evento de milho MIR604 numa amostra biológica compreendendo uma primeira molécula sonda que compreende pelo menos 11 nucleótidos contíguos que é uma sequência de nucleótidos ou é complementar da mesma entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 3 de cerca da posição do nucleótido 792 até à posição do nucleótido 811 e uma segunda molécula sonda que compreende pelo menos cerca de 11 nucleótidos contíguos que é uma sequência de nucleótidos ou é complementar da mesma selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 4 de cerca da posição do nucleótido 497 até à posição do nucleótido 516, em que a referida molécula se hibridiza especificamente com a sequência de nucleótidos em condições de hibridação de elevado rigor.

A forma de realização 33 refere-se a um método para detetar a presença do DNA do evento de milho MIR604 de numa amostra biológica, compreendendo:

- (a) colocar a amostra em contacto com um iniciador de polinucleótidos e um segundo iniciador de polinucleótidos que funcionam conjuntamente numa reação de amplificação de ácido nucleico na presença de um modelo de DNA do evento de milho MIR604 para produzirem um amplicão diagnóstico para o evento de milho;
- (b) realizar uma reação de amplificação de ácido nucleico, produzindo, desse modo, o amplicão; e
- (c) detetar o amplicão.

A forma de realização 34 refere-se ao método da forma de realização 33, em que o amplicão compreende uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na

SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, e sequências complementares da mesma.

A forma de realização 35 refere-se ao método da forma de realização 33, em que o amplicão compreende a SEQ ID NO: 1, em que a primeira sequência de iniciadores de polinucleótidos é selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 15, e sequências complementares da mesma, e em que a segunda sequência de iniciadores de polinucleótidos é selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 38, e sequências complementares da mesma.

A forma de realização 36 refere-se ao método da forma de realização 33, em que o amplicão compreende a SEQ ID NO: 2, em que a primeira sequência de iniciadores de polinucleótidos é selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 39 a SEQ ID NO: 46, e sequências complementares da mesma, e em que a segunda sequência de iniciadores de polinucleótido é selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 38, e sequências complementares da mesma.

A forma de realização 37 refere-se a um método para detetar o DNA de evento de milho MIR604 numa amostra biológica, compreendendo:

(a) colocar uma amostra que compreende o DNA em contacto com uma sonda de polinucleótido que hibridiza em condições de alta estringência e lavagem com o DNA de MIR604 e que não hibridiza em condições de alta estringência e lavagem com o DNA de uma planta de milho que não seja MIR604;

- (b) submeter a amostra e a sonda à hibridização de alta estringência e lavagem; e
- (c) detetar a hibridização da sonda ao DNA do evento MIR604.

A forma de realização 38 refere-se a uma amostra biológica derivada de uma planta, tecido, ou sementes de milho do evento MIR604, em que a amostra compreende uma sequência de nucleótidos que é uma sequência de nucleótidos ou é complementar da mesma selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, e em que a sequência é detetável no extrato usando um método de amplificação de ácidos nucleicos ou de hibridização de ácidos nucleicos.

A forma de realização 39 refere-se à amostra biológica da forma de realização 38, em que a amostra é selecionada de entre o grupo que consiste em farinha de milho, fubá, xarope de milho, óleo de milho, amido de milho, e cereais fabricados no seu todo ou em parte de modo a conterem subprodutos de milho.

A forma de realização 40 refere-se a um extracto derivado de uma planta, tecido, ou sementes de milho do evento MIR604 que compreende uma sequência de nucleótidos homóloga ou complementar a uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2.

A forma de realização 41 refere-se ao extracto da forma de realização 40, em que a sequência é detetável no extrato usando um método de amplificação de ácidos nucleicos ou de hibridização de ácidos nucleicos.

A forma de realização 42 refere-se ao extracto da forma de realização 41, em que a amostra é selecionada entre o grupo que consiste em farinha de milho, fubá, xarope de milho, óleo de milho, amido de milho, e cereais fabricados no seu todo ou em parte de modo a conterem subprodutos de milho.

A forma de realização 43 refere-se a um método para produzir uma planta de milho resistente pelo menos à infestação pela lagarta da raiz do milho, que compreende:

(a) cruzar sexualmente uma primeira planta de milho progenitora com uma segunda planta de milho progenitora, em que a referida primeira ou segunda planta de milho progenitora compreende DNA do evento de milho MIR604, produzindo-se assim uma pluralidade de plantas descendentes de primeira geração;

(b) selecionar uma planta descendente de primeira geração que é resistente pelo menos à infestação pela lagarta da raiz do milho;

(c) autofecundar a planta descendente de primeira geração, produzindo-se deste modo uma pluralidade de plantas descendentes de segunda geração;

(d) selecionar entre as plantas descendentes de segunda geração, uma planta que seja resistente pelo menos à infestação pela lagarta da raiz do milho;

em que as plantas descendentes de segunda geração compreendem uma sequência de nucleótidos selecionada entre o grupo que consiste na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2.

LISTAGEM DAS SEQUÊNCIAS

<110> Syngenta Participations AG

<120> Evento de Milho MIR604

<130> M2489 EP/2 BS

<154> US 60/556,260

<151> 2004-03-25

<160> 63

<170> PatentIn versão 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<221> característica mista

<222> (1)..(24)

<223> junção genoma-inserção 5'

<400> 1

aattcaacag aaggcgggaa

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<221> característica mista

<222> (1)..(24)

<223> junção inserção-genoma 3'

<400> 2

tgttattaag agttggtggt

20

<210> 3

<211> 1312

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<221> característica mista

<222> (1)..(1310)

<223> sequência genoma+inserção 5'

<400> 3

```

ccccgcggtt cgttgccctt ggccggfacc catttggegc cgattctttt cttgcccccc 60
ggccggctgc tcgctcgcct ttggattctt ccaaagccgc tgatgggatg gtggcgaaca 120
caccaccac ccgtctttgc ccaaagcgac ccggcacagg ccgcgctggc ttcactaacc 180
actagcgctt gtaactaata aatggtttct agcgtttgtt gctctctttt tctcttttct 240
gcccgttctt cggagccgtg tggacactgg acagcgteca gtccagcagg catagggtgg 300
tctcggcggc ggtcgtctga cgacgatcga tctccatgag attcccgagc agcaccaggac 360

ggaaagetgg gcccttctca ccaattecgg tcggagecgg aacaagattc cctcccccaa 420
tcatttcgac gcgccccttc ttcccaacc ctcgtggcgg tgtttcgcgg ccggccetta 480
tctctctccc gtgacgcggt cttttgtagc tttagcggcg gcacgttget aaccaggcta 540
gcttcggttc ttttlaatct gcctatcgag aagagaagaa aaattcgtcc atggggccac 600
ggcctcttct gcaggcattt ggcattgtaa ggaacccgaa ccagtgaatg gagatggagc 660
gatgctgctc agatacgcag tcaaacctgc cggcgaatc acggggggag ctggctggct 720
ggctggctgg acgccagatc acacatggat gacgcggcac ggcagctagc cgagcaggcg 780
ctctgcgtac gcaattcaac agaaggcggg aaacgacaat ctgatcatga gcggagaatt 840
aaggagatca cgttatgacc cccgccgatg acgcgggaca agccgtttta cgtttggaac 900
tgacagaacc gcaacgctgc aggaattggc cgcagcggcc atttaaatca attggcgcg 960
ccgaattcga gctcggtaaa agcttgcaca tgacaacaat tgtaagagga tggagaccac 1020
aacgatccaa caatacttct gcgacgggct gtgaagtata gagaagttaa acgccccaaa 1080
gccatttgtt ttggaatttt tagttattct atttttcatg atgtatcttc ctctaactg 1140
ccttaatttg caaatttggc ataactactg attgaaaata taigtatgta aaaaaatact 1200
aagcatattt ttgaagctaa acatgatgtt atttaagaaa atatgtrgtt aacagaataa 1260
gattaatatc gaaatggaaa catctgaaa ttagaatcat cttacaagct aa 1312

```

<210> 4

<211> 1570

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<221> característica mista

<222> (1)..(1570)

<223> sequência inserção+genoma 3'

<400> 4

```

ttgtggaaag gttctcagca gttacagctt aaaccgggtg aatcagecgtt tattgccgcc 60
aacgaatcac cggtgactgt caaaggccac ggccgtttag cgcgtgttta caacaagctg 120
taagagctta ctgaaaaaat taacatctct tgctaagctg ggagctegat ccgtcgacct 180
gcagatcgtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt tgccggctct 240
ggcatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat taacatgtaa 300
tgcattgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcatt atacatttaa 360
tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aaclaggata aattatcgcg cgcggtgtca 420
tctatgttac tagatctgct agccctgcag gaaatttacc ggtgcccggg cgccagcat 480
ggccgtatcc gcaatgtgtt attaagagtt ggtggtacgg gtactttaac taacgaggtg 540
tgtcgcgcag cgtctctgca cggatgtage tttggattgc tggataatgt ctccgcgaag 600
cgtcgtatrr atttatrrat ttattacage ctccaccgac gtgcgtgctc cgtttcggat 660
tataataaaa ctaatatrra afaaaaaaat cggattaag gatgtttccg aaataaagar 720

ctccaccaca ggagcgaag aaaaaaaaaag agaaacgggc tatggagaaa tgggtgttgcg 780
agtatacggc ggctccgctg tcgtcggatc gacatgtaca aagtaggtgc acaaaaggca 840
aagcaaaatc acctcatcaa agaccaaaag cggagcaaaag aatcgatact aaatccacat 900
gttttttttg ttctgtctc ctacgtgctg tgctgtgctg tgaagcacga ttagtacgtg 960
tactcactct tgtcatatc tttttagtgt ctgttacta gtcacatgga gtagcaacca 1020
tggctggcga taccgcgat aaaaaaaaaa agagagagg gagtaataa ttagatactc 1080
accattata aattataaaa ttttttagag tttgaatagg tagttcttgt atatttattt 1140
atagaccctc aagtttgctc gcctctcgag agccgaactt tgttgeccat gcttccccgg 1200
ctcaggtcat gccacctcct tcaccaaggg cacacggaag atctggtgaa gcttgtcctc 1260
accccgccc cttcaaacat gtgaggatgc gtcgtcgtg gcactagtag cactcatgct 1320
aggcactact ttgacagttt cctccaaata tgtagttagg aaacacttga acaacacggt 1380
tgggattact tatgatgtt ggtingtcca tcaatgataa ttccttcttc ttgcttaatg 1440
attggctcta gaaccgatac ttggcacatt tcatcaggaa gggcgcctgc acnaatttaa 1500
cctgttatcg atgttccggt tcctaagttg aagaaaaca tggctaaca ttagcccatg 1560
tgagcataac 1570

```

<210> 5

<211> 801

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<221> característica mista

<222> (1)..(801)

<223> sequência de flanqueamento 5'

<400> 5

```

ccccgggttt cgttgccccct ggccggtaacc catttggcgc cgattctttt cttgcccccc 60
ggccggccgc tcgctcgect ttggattctt ccaaagccgc rgatgggatg gtggegaaca 120
caccaccac ccgtctttgc ccaaagcgc ccggcacagg ccgcgccggc ttcactaacc 180
actagcgctt gtaactaataa aatggtttct agcgtttgtt gctctctttt ttcttttttc 240
gccggttctt cggagccctg tggacactgg acagcgtcca gtccagcagg catagggtgg 300
tctcggcggc ggtcgtccga cgcgcatcga tctccatgag attccgcgac aggccaggac 360
ggaaagctgg gccctttctc ccaattcgcg tcggagccgg aacaagattc cctcccccaa 420
tcatttcgac gcgcccttcc ttgcaccaccc ctctgtggccg tgtttcgcgg ccggccctta 480
tctcttccc gtagcgcgtt cttttgtagc tttagcggccc gcacgttgc aaccaggcta 540
gcttcgttcg tttttaatct gcctatcag aagagaagaa aaattcgtcc atggggccac 600
ggcctcttct gcaggcattt ggcattgtgaa ggaaccgaa ccagtgaatg gagatggacg 660
gatgctgctc agatacgcag tcaaacctgc cggcgaatc acggggggag ctggctgct 720
ggctggctgg atgccagatc acatctggat gacgcggcac ggcagctagc cgagcaggcg 780

ctctgcgcac gcaattcaac a 801

```

<210> 6

<211> 1064

<212> DNA

< 213> Zea mays

<220>

<221> característica mista

<222> (1)..(1064)

<223> sequência de flanqueamento 3'

<400> 6

```

agttgggtgt acgggtactt taactaacga ggtgtgtcgc gcagcgtccc tgcacggatg 60
tagctttgga ttgctggata atgtctcgcg caagcgtcgt atttatttat ttatttatta 120
cagccctccac cggcgtcgtt gctcgttttc ggattataat aaaactaata ttaataaaaa 180
aaatcggatt aaaggatggt tccgaaataa agatctccac cacaggagcg aaagaaaaaa 240
aaagagaaac gggctatgga gaaatggtgt tgcgagtata cggcggctcc gtcgtcgtcg 300
gatcgacatg tacaaagtag gtgracaataa ggcaaaagcaa aatcacttca tcaaagacca 360
aaagcggagc aaagaatcga tactaaatcc acatgtrttt tttgttccig tetactacgt 420
gctgtgcctg tgcgtgaagc acgattagta cgtgtactca ctcttgtcat attcttttta 480
gtgtctttgt actagtcaca tggagtagca accatggctg gcgataccg cgataaataa 540
aaaaagagaga gagggagtaa tatattagat actcaccat tataaattat aaaatatttt 600
agagtttgaa taggtagtgc ttgtatattt atttatagac ctccaagttt gtccgcctct 660
cgagagccga actttgttgc ccatgcttcc ccggctcagg tcatgccacc tctticacca 720
agggcacacg gaagatctgg tgaagcttgt catcaccctg cggccttcaa acatgtgagg 780
atgctcgtc gcctggcacta gttagcactca ttgtaggcac tactttgaca gtttctctca 840
aataigtagt gaggaaacac ttgaacaaca cgtttgggat tacttatgat gtttggttng 900
tccatcaatg ataattcctt ctctctgctt aatgattggc tctagaaccg atacttggca 960
catttcacga ggaaggggcg atgcacnaat ttaacctggt atcgatgttc cggttcctaa 1020
gttgaagaaa acaatggcta acaattagcc catgtgagca taac 1064

```

<210> 7  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> iniciador MIR604(59)

<400> 7  
cgctcgcctt tggattcttc 20

<210> 8  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> iniciador MIR604(60)

<400> 8  
aagccgctga tgggatggt 19

<210> 9

<211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador MIR604(54)  
  
 <400> 9  
 cgttcgtttt taatctgcct atcg 24  
  
 <210> 10  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador MIR604(55)  
  
 <400> 10  
 aggcatttgg catgtgaagg aa 22  
  
 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador MIR604(38)  
  
 <400> 11  
 atgtgaagga acccgaacca g 21  
  
 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador MIR604(39)  
  
 <400> 12  
 gtgaatggag atggacggat g 21  
  
 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
  
 <220>

<223> iniciador MIR604 (51)  
  
 <400> 13  
 cagatcacac atggatgacg c 21  
  
 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador 604 SEM  
  
 <400> 14  
 gtgacgcggtt cttttgtagc 20  
  
 <210> 15  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador 5'S1  
  
 <400> 15  
 tgaatggaga tggacggatg ctg 23  
  
 <210> 16  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador MTL (11)  
  
 <400> 16  
 attagaatca tcttacaagc taa 23  
  
 <210> 17  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador MTL (10)  
  
 <400> 17  
 ctaagagatg ttcacgcttt gag 23

<210> 18  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador MTL AS  
  
 <400> 18  
 gactcaacga aggctgctgc 20  
  
 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador WRSEN-1  
  
 <400> 19  
 gcatgtctct gtgtcctcgt 20  
  
 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador WRAS-1  
  
 <400> 20  
 aggcacgcta tcggaggtta 20  
  
 <210> 21  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador WR-1  
  
 <400> 21  
 ggacatcgcc gagttctaca 20  
  
 <210> 22  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial

<220>  
<223> iniciador WR-2

<400> 22  
gatgtgcttc ctgatgcagg 20

<210> 23  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> iniciador WRSEN-2

<400> 23  
caagcaaata agacgacttg 20

<210> 24  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> iniciador WRAS-2

<400> 24  
agcaccacca aggacgtgat 20

<210> 25  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> iniciador WRSEN-3

<400> 25  
tacaacagct tcaacctggc 20

<210> 26  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> iniciador WRAS-3

<400> 26  
ccgtgaacta gatctgagct 20

<210> 27  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador 5161S  
  
 <400> 27  
 tcaaccaata ctacttcgac aa 22  
  
 <210> 28  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador 5'AS1  
  
 <400> 28  
 acaagaccat caacaagggc gac 23  
  
 <210> 29  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador WRSEN-4  
  
 <400> 29  
 atcggcgttc cggtcctatgg tt 22  
  
 <210> 30  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador WRAS-4  
  
 <400> 30  
 ggaatcctgg gatggctcta 20  
  
 <210> 31  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial

<220>  
<223> PMI-1

<400> 31  
gatgtgcttc ctgatgcagg 20

<210> 32  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> iniciador PMI-2

<400> 32  
ctggaagtga tggcaaac 18

<210> 33  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> iniciador PMI(6)

<400> 33  
cgctgcatga ccttagtgat a 21

<210> 34  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> iniciador PMI(7)

<400> 34  
cgggtgaatc agcgtttatt g 21

<210> 35  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> iniciador PMI(5)

<400> 35  
ttgccgcaa cgaatcac 18

<210> 36  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador PMI(16)  
  
 <400> 36  
 agtcccgcga ttatacattt aat 23  
  
 <210> 37  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador WRSEN-5  
  
 <400> 37  
 gaaaatgccg caggtatccc 20  
  
 <210> 38  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador WRAS-5  
  
 <400> 38  
 caggtgcaca tccggcgatt 20  
  
 <210> 39  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador MIR604(20)  
  
 <400> 39  
 gctcctgcac ggatgtagct 20  
  
 <210> 40  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> iniciador MIR604(21)

<400> 40  
 gctttggatt gctggataat gtc 23

<210> 41  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> MIR604 (31)

<400> 41  
 ccaccacagg agcgaaagaa aaa 23

<210> 42  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> iniciador MIR604(30)

<400> 42  
 gggctatgga gaaatggtgt tg 22

<210> 43  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> iniciador MIR604(40)

<400> 43  
 cttcaccaag ggcacacgg 19

<210> 44  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> iniciador MIR604(41)

<400> 44  
 atgtgaggat gcgtcgtcg 19

<210> 45  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> iniciador 9268AS

<400> 45  
cacggatgta gctttggatt 20

<210> 46  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> iniciador WRAS-6

<400> 46  
tccaccacag gagcgaaaga 20

<210> 47  
<211> 22  
<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> TaqMan cry3A055 direta

<400> 47  
atcgagagct gggatgaactt ca 22

<210> 48  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> TaqMan cry3A055 reversa

<400> 48  
cgatcaggtc cagcacgg 18

<210> 49  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sonda para cry3A055 TaqMan  
  
 <400> 49  
 ccgctaccgc cgcgagatga 20  
  
 <210> 50  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> TaqMan pmi direta  
  
 <400> 50  
 ccgggtgaat cagcgttt 18  
  
 <210> 51  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> TaqMan pmi reversa  
  
 <400> 51  
 gccgtggcct ttgacagt 18  
  
 <210> 52  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> sonda para pmi TaqMan  
  
 <400> 52  
 tgccgccaac gaatcaccgg 20  
  
 <210> 53  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador ZmADH-267  
  
 <400> 53  
 gaacgtgtgt tgggtttgca t 21

<210> 54  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> iniciador zmADH-337

<400> 54  
 tccagcaatc cttgcacctt 20

<210> 55  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Sequência Artificial

<220>  
 <223> sonda ZmADH-316

<400> 55  
 tgcagcctaa ccatgcgag ggta 24

<210> 56  
 <211> 779  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> sonda para MIR604

<400> 56

```

ggacatcgcc gagttctaca agcgccagtt gaagctgacc caggagtaca ccgaccactg 60
cgtgaagtgg tacaacgtgg gtctagacaa gttccgcggc agcagctacg agagctgggt 120
gaacttcaac cgctaccgcc gcgagatgac cctgaccgtg ctggacctga tgcacctgtt 180
ccccctgtac gacgtgcgcc tgtaccccaa ggaggtgaag accgagctga cccgcgagct 240
gctgaccgac cccatcgtgg gcytgaacaa cctgcgcggc tacggcacca ccttcagcaa 300
catcgagaac tacatccgca agccccacct gtctgactac ctgcaccgca tccagttcca 360
cargrgittc cagccccgct actacggcaa cgacagcttc aactactgga gcggcaacta 420
egtgagcacc cgccccagca tcggcagcaa cgacatcatt accagccctt tctacggcaa 480
caagagcagc gagccccgtc agaacccttg gtccaacggc gagaaggtgt accgcgccgt 540
ggctaacacc aacctggctg tgtggccctc tgcagtgtac agcggcgtga ccaaggtgga 600
gttcagccag tacaactgacc agaccgacga ggcacagacc cagacctacg acagcaagcg 660
caactgtggc gccgtgagct gggatagcat cgaccagctg ccccccgaga ccaccgacga 720
gccccgtgag aagggctaca gccaccagct gaactacgtg atgtgcttcc tgatgcagg 779

```

<210> 57  
 <211> 183  
 <212> DNA  
 <213> Agrobacterium tumifaciens

<220>  
 <221> característica mista  
 <222> (1)..(183)  
 <223> Região de fronteira direita

<400> 57

gaagcgggg aacgacaatc tgatcatgag cggagaatta agggagtcac gttatgaccc	60
ccgccgatga cgcgggacaa gccgitttac gtttgggaact gacagaaccg caacgetgca	120
ggaattggcc gcagcggcca tttaaatcaa ttgggcgcgc cgaattcgag ctccgtacaa	180
gct	183

<210> 58  
 <211> 2556  
 <212> DNA  
 <213> Zea mays

<220>  
 <221> característica mista  
 <222> (1)..(2556)  
 <223> promotor MTL

<400>58

tgccacatgac	aacaattgta	agaggatgga	gaccacaacg	atccaacaat	acttctgcga	60
cgggctgtga	agtatagaga	agttaaacgc	ccaaaagcca	ttgtgtttgg	aatttttagt	120
tattctattt	ttcatgatgt	atcttctctt	aacatgcctt	aatttgcaaa	tttggfataa	180
ctactgattg	aaaatatatg	tatgtaaaaa	aatactaagc	atatttttga	agctaaacat	240
gatgttattt	aagaaaaat	gttgttaaca	gaataagatt	aatatcgaaa	tggaaacatc	300
tgtaaattag	aatcatrifa	caagctaaga	gatgtttcacg	ctttgagaaa	cttcttcaga	360
tcatgaccgt	agaagtagct	ctccaagact	caacgaaggc	tgtctcaatt	ccacaaatgc	420
atgacatgca	tccttgtaac	cgctcgtcgc	gcataaaca	cggataactc	aattccctgc	480
tcacatcaat	tagaaatgag	caagcaagca	cccgatcgc	caccccatat	gcaccaatct	540
gactcccaag	ctctgtttcg	cattagtacc	gccagcactc	cacctatagc	taccaattga	600
gacctttcca	gcctaagcag	atcgattgat	cgttagagtc	aaagagttgg	tggtacgggt	660
actttaacta	ccatggaatg	atggggcgtg	atgtagagcg	gaaagcgcct	ccctacgcgg	720
aaacaacccc	tcgccatgcc	gctcgactac	agcctcctcc	tcgtcggcgc	cacaacgagg	780
gagcccgtgg	tcgcagcccac	cgaccagcat	gtctctgtgt	ctctgtccga	cttcgacatg	840
tcatggcaaa	cagtcggacg	ccagcaccag	actgacgaca	tgagtctctg	aagagcccgc	900
cacctagaaa	gatccgagcc	ctgctgctgg	tagtggtaac	cattttcgtc	gcgctgacgc	960
ggagagcgag	aggccagaaa	tttatagcga	ctgacgctgt	ggcaggcatg	ctatcggagg	1020
ttacgacgtg	gcgggtcact	cgacgaggag	ttcacaggtc	ctatccttgc	atcgctcggc	1080
gcggagttta	cggggactta	tccttacgac	gtgctctaag	gttgcgataa	cgggcggagg	1140
aaggcgtgtg	gcgtgcggag	acggtttata	cacgtagtgt	gcgggagtgt	gtttcgtaga	1200
tcgccccaaa	cacgacgact	tacgaaggtt	agtggaggag	gaggacacac	taaaatcagg	1260
acgcaagaaa	ctcttctatt	atagtagtag	agaagagatt	ataggagtgt	gggttgattc	1320
taaagaaaaat	cgacgcagga	caaccgtcaa	aacgggtgct	ttaatatagt	agatataat	1380
atatagagag	agagagaaaag	tacaaaggat	gcatttgtgt	ctgcatatga	tcggagtatt	1440
actaacggcc	gtcgtaaaga	ggtccatcat	gcgtggagcg	agcccatttg	gttggttgtc	1500

```

aggcgcagt taaggcctcc atatatgatt gtcgtcgggc ccataacagc atctctctcca 1560
ccagtttatt gtaagaataa attaagtaga gatatttgtc gtcgggcaga agaaaacttgg 1620
acaagaagaa gaagcaagct aggccaatTT cttgctggca agaggaagat agtggcctct 1680
agtifatata tcggcgtgat gatgatgctc cttagctagaa atgagagaag aaaaaacggac 1740
gctgttttgg tctgtgtcaa tggcgtccat ccttccatca gatcagaacg atgaaaaagt 1800
caagcacggc atgcatagta tatgtatagc ttgttttagt gtcgctttgc tgagacgaat 1860
gaaagcaacg gcgggcatat ttttcagtgg ctgtagcttt caggctgaaa gagacgtggc 1920
atgcaataat tcagggaatt cgtcagccaa ttgaggtagc tagtcaactt gtacattggt 1980
gctgagcaatt ttccgcactc aggagggcta gtttgagagt ccaaaaaacta taggagatta 2040
aagaggctaa aatcctctcc ttatttaatt ttaataagt agtgtatttg tattttaact 2100
cctccaaccc tccgatttt atggctctca aactagcatt cagtctaatg catgcatgct 2160
tggctagagg tcttatgggg ttgttaatag catagctagc tacaagttaa ccgggtcttt 2220
tatatttaat aaggacaggc aaagtattac ttacaaataa agaataaagc taggacgaac 2280
tgctggatta ttactaaatc gaaatggacg taatattcca ggcaagaata attgttcgat 2340
caggagacaa gtggggcatt ggaccggtc ttgcaagcaa gagcctatgg cgtggtgaca 2400
cggcgcgttg ccatacactc atgcttccat cgatgatcca tcttcacttg ctataaaaag 2460
aggtgtccat ggtgctcaag ctcagccaag caaataagac gacttgtttc attgattctt 2520
caagagatcg agcttctttt gcaccacaag gtcgag 2556

```

<210> 59  
<211> 1797  
<212> DNA  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> gene cry3A055

<400> 59

```

atgacggccg acaacaacac cgagggccctg gacagcagca ccaccaagga cgtgatccag 60
aagggcatca gcgtggtggg cgacctgctg ggcgtgggtg gcttccccctt cggcggcgcc 120
ctggtgagct tctacaccaa cticctgaac accatctggt ccagcgagga cccctggaag 180
gccttcatgg agcagggtga ggccctgatg gaccagaaga tcgccgacta cgccaagaac 240
aaggcactgg ccgagctaca gggccctccag aacaacgtgg aggactatgt gagcgcctg 300
agcagctggc agaagaaccc cgtgcaccg ttccgcaacc cccacagcca gggccgcatc 360
cgcgagctgt tcagccaggc cgagagccac ttccgcaaca gcctgcccag cttcgccatc 420
agcggctacg aggtgctggt cctgaccacc tacgccagg ccgccaacac ccacctgttc 480
ctgctgaagg acgcccacat ctacggagag gagtggggct acgagaagga ggcacatgcc 540
gagttctaca agcgcagct gaagctgacc caggagtaca ccgacctctg cgtgaagtgg 600
tacaacgtgg gtctagacaa gttccgccc agcagctacg agagctgggt gaacttcaac 660

cgctaccgcc gcgagatgac ctgaccgtg ctggacctga tcgccctgtt cccccgtac 720
gacgtgcgcc tgtaccccaa ggagggaag accgagctga cccgcgagct gctgaccgac 780
cccctcgtgg gcgtgaacaa cctgcgccc tacggcatta cctttagcaa catcgagaac 840
tacatccgca ageccccact gttcgactac ctgcaccgca tccagttcca caccgcttcc 900
cagcccggct actacggcaa cgacagcttc aactactgga gcggcaacta cgtgagcacc 960
cgccccagca tcggcagcaa cgacatcacc accagcccc tctacggcaa caagagcagc 1020
gagcccgtgc agaaccttga gttcaacggc gagaagggtg accgcgccgt ggctaacacc 1080
aacctggcgg tgtggccctc tgcagtgtac agcggcgtga ccaaggtgga gttcagccag 1140
tacaacgacc agaccgacga ggcagcacc cagacctarg acagcaagcg caacgtgggc 1200
gccgtgagct gggacagcat cgaccagctg ccccccgaga ccaccgacga gccctcgag 1260
aagggctaca gccaccagct gaactacgtg atgtgcttcc tgatgcaggg cagccggggc 1320
accatccccg tgctgacctg gaccacaaag agcgtcgact tcttcaacat gatcgacagc 1380
aagaagatca cccagctgcc cctggtgaag gcctacaagc tccagagcgg cgcagcgtg 1440
gtggcaggcc cccgcttacc cggcggcgac atcatccagt gcaccgagaa cggcagcggc 1500
ggcaccatcc acgtgacccc cgargtgagc tacagccaga agtaccggcc ccgcatccac 1560
tacgccagca ccagccagat caccitcacc ctgagcctgg acggggcccc cttcaaccaa 1620
tactacttcc acaagaccat caacaaggcc gacacctga cctacaacag cttcaacctg 1680
gccagcttca gcaccccttt cgagctgagc ggcaacaacc tccagatcgg cgtgaccggc 1740
ctgagcggcc gcgacaaggc gtacatcgac aagatcgagt tcatccccgt gaactag 1797

```

<210> 60  
<211> 253  
<212> DNA  
<213> *Agrobacterium tumifaciens*

<220>  
<221> característica mista  
<222> (1)..(253)

<223> terminador NOS

<400> 60

```

gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgc 60
atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180
gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct 240
atgttactag atc 253

```

<210> 61

<211> 1993

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<221> característica mista

<222> (1)..(1993)

<223> promotor ZmUbInt

<400> 61

ctgcagtgc	gcgtgaccgc	gtcgtgccc	tctctagaga	taafgagcat	fgcatgrcta	60
agttataaaa	aattaccaca	tatTTTTTT	gtcacacttg	tttgaagtgc	agtttatcta	120
tctttataca	tatattttaa	ctttactcta	cgaataatat	aatctatagt	actacaataa	180
tattcagtgt	ttagagaatc	atataaatga	acagttagac	atggtctaaa	ggacaattga	240
gtattttgac	aacaggactc	tacagtttta	tctttttagt	gtgcatgtgt	tctcttttt	300
ttttgcaaat	agcttcaect	atataatact	tcatccattt	tattagtaca	tccatttagg	360
gfttaggggt	aatggTTTT	atagactaat	tttttttagt	catctatrrt	attctatrrt	420
agcctctaaa	ttaaagaaaa	taaaactcta	tttttagttt	tttatttraat	aatttagata	480
taaaatagaa	taaaataaag	tgactaaaaa	ttaaacaaat	accctttaag	aaattraaaaa	540
aactaaggaa	acatttttct	tgtttcgagt	agataatgcc	agcctgttaa	acgccgtcga	600
cgagtctaac	ggacaccaac	cagcgaacca	gcagcgtcgc	gtcgggcca	gcgaagcaga	660
cggcacggca	tctctgtcgc	tgctctcgg	ccccctcga	gagttccgct	ccaccgtrgg	720
actgtctccg	cgtcggcat	ccagaaattg	egtggcggag	cggcagacgt	gagccggcac	780
ggcaggcggc	ctctctctc	tctcacggca	ccggcagcta	cgggggatte	ctttcccacc	840
gctctctcgc	tttcccttcc	tcgcccgcgc	taataaatag	acacccctct	cacacccctt	900
ttccccaaac	tcgtgttgtt	cggagcgcac	acacacacaa	ccagatctcc	ccccaaatcca	960
cccgtcggca	ctctcgttcc	aaggtaegee	gctcgtctcc	ctccccctcc	ctctcttacc	1020
ttctctagat	cggcgttccg	gtccatggtt	agggcccggg	agttctactt	ctgttcatgt	1080
ttgrgttaga	tccgtgtttg	tgtagatcc	gtgctgctag	cgttcgtaca	cggatgcgac	1140
ctgtacgtca	gacacgttct	gattgctaac	ttgccagtgt	tctctttttg	ggaatcctgg	1200
gatggctcta	gccgttccgc	agacgggatc	gatttcatga	ttttttttgt	ttcgttgcac	1260
agggtttggg	ttgccctttt	ccittatttc	aatatatgcc	gtgcacttgt	ttgtcgggtc	1320
atcttttcat	gcTTTTTTTT	gtcttggttg	tgatgatgtg	gtctggttgg	gcggtcgttc	1380
tagatcggag	tgaattctg	tttcaacta	cttgggtggat	ttattaattt	ttgatctgta	1440
tgtgtgtgcc	atacatattc	atagttacga	attgaagatg	atggatggaa	atategatct	1500
aggataggta	tacatgttga	tgccggtttt	actgatgcat	atcacagagat	gctttttggt	1560
cgtctgggtg	tgatgatgtg	gtgtggttgg	gcggtcgttc	attcgttcta	gatcggagta	1620
gaatactggt	tcaaaactacc	tggtgtatrr	attaatrrtt	gaactgtatg	tgtgtgtcat	1680
acatcttcat	agttacgagt	ttaaagatgga	tggaaatate	gatctaggat	aggtatacat	1740
gttgatgtgg	gttttactga	tgcatataca	tgatggcata	tgacagcatct	attcatatgc	1800
tctaaaccttg	agtacctatc	tattalaata	aacaagtatg	ttttataatt	attttgatct	1860
tgatatactt	ggatgatggc	ataigcagca	gctatatgtg	gatTTTTTTT	gccctgcctt	1920
catacgctat	ttatrrtgcct	ggtaetgrrt	cttttgcgca	tgctcaccct	gttgttrggg	1980
gttacttctg	cag					1993

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 1176

<212> DNA  
 <213> E.coli

<220>  
 <221> característica mista  
 <222> (1)..(1176)  
 <223> gene pmi

<400> 62

```

atgcaaaaaac tcattaactc agtgcaaaaaac tatgcctggg gcagcaaaaac ggcgttgact      60
gaactttatg gtatggaaaaa tccgtccagc cagccgatgg ccgagctgtg gatgggcgca      120
catccgaaaaa gcagttcacg agtgcagaat gccgccggag atatcgtttc actgcgtgat      180
gtgattgaga gtgataaatc gactctgtct ggagaggccg ttgccaaaac ctttggcgaa      240
ctgcctttcc tgttcaaagt attatgcgca gcacagccac tetccattca ggttcatcca      300
aacaaacaca attctgaatc cggttttgcc aaagaaaatg ccgcaggtat cccgatggat      360
gccgccgagc gtaactataa agatcctaac cacaagccgg agctggtttt tgcgctgacg      420
cctttccttg cgatgaacgc gtttcgtgaa ttttccgaga ttgtctccct actccagccg      480
gtcgcaggtg cacatccggc gattgctcac tttttacaac agcctgatgc cgaacgttta      540
agcgaactgt tcgccagcct gttgaatatg caggggtgaag aaaaatcccg cgcgctggcg      600
attttaaaat cggccctcga tagccagcag ggtgaaccgt ggcaaacgat tcgtttaatt      660
tctgaatttt acccggaga cagcggctctg ttctccccgc tattgctgaa tgtggtgaaa      720
ttgaaccctg gcgaagegat gttcctgttc gctgaaacac cgcacgctta cctgcaaggc      780
gtggcgctgg aagtgatggc aaactccgat aacgtgctgc gtgcgggtct gacgcctaaa      840
tacattgata ttccggaact ggttgccaat gtgaaattcg aagccaaacc ggctaaccag      900
ttgttgacce agccggtgaa acaagggtgca gaactggact tcccgatfcc agtggatgat      960
tttgccttet cgetgcatga ccttagtgat aaagaaacca ccattagcca gcagagtgcc     1020
gccatfttgt tctgcgtcga aggcgatgca acgtttgtga aaggttctca gcagttacag     1080
ctttaaaccgg gtgaatcagc gtttattgcc gccaacgaat caccggtgac tgtcaaaggc     1140
cacggccggt tagcgcgtgt ttacaacaag ctgtaa

```

<210> 63  
 <211> 323  
 <212> DNA  
 <213> Agrobacterium tumifaciens

<220>  
 <221> característica mista  
 <222> (1)..(323)  
 <223> Região de fronteira esquerda

<400> 63

```
gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggccttgc 60
atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
atgacggtat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180
gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct 240
atgttactag atctgctagc cctgcaggaa atttaccggt gcccgggcgg ccagcatggc 300
cgtatccgca atgttatt aag 323
```

Lisboa, 6 de outubro de 2016

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Método para identificar uma planta de milho compreendendo o inserto heterólogo de MIR604 compreendendo um gene *cry3A055* de SEQ ID NO: 59 flanqueado por sequências de nucleótidos apresentadas em SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 3, e SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4, respectivamente, ou por seus complementos, dentre outras plantas de milho que não compreendem o referido inserto heterólogo, compreendendo as etapas de:
  - (a) amplificação de uma sequência de DNA alvo da planta de milho a ser identificada utilizando iniciadores de nucleótidos compreendendo uma primeira sequência de DNA compreendendo pelo menos cerca de 11 nucleótidos contíguos selecionados do grupo consistindo dos nucleótidos 792-811 de SEQ ID NO: 3; nucleótidos 497-516 de SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; e seus complementos, e uma segunda sequência de DNA, que está compreendida na sequência de DNA do inserto heterólogo selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62; SEQ ID NO: 63, e seus complementos; e
  - (b) identificação da planta de milho compreendendo o inserto heterólogo de MIR604 dentre outras plantas de milho.
  
2. Uso de uma planta de milho identificada no método da reivindicação 1 compreendendo o inserto heterólogo de MIR604 para o controlo de pragas de insetos.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 2, em que a praga de inseto coleóptero é selecionada do grupo consistindo na *Diabrotica virgifera virgifera*, a lagarta da raiz do milho ocidental, *Diabrotica virgifera zea*, a lagarta da raiz do milho mexicana, e a *Diabrotica longicornis barberi*, a lagarta da raiz do milho do norte.
4. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 ou 3, em que as sementes da referida planta de milho são tratadas com produtos químicos de tratamento de sementes.
5. Uso, de acordo com a reivindicação 4, em que o referido produto químico é um inseticida.
6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, em que o referido inseticida é Cruiser®.
7. Uso, de acordo com a reivindicação 4, para promover um aumento ou sinergia da atividade inseticida da proteína Cry3A055.
8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, para aumentar o espectro de atividade e a eficácia da proteína expressa e do produto químico.

Lisboa, 6 de outubro de 2016



