



**Assinado
Digitalmente**

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0608667-5

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0608667-5

(22) Data do Depósito: 04/04/2006

(43) Data da Publicação do Pedido: 19/10/2006

(51) Classificação Internacional: C12N 15/82; C12Q 1/68

(30) Prioridade Unionista: EP 05 075833.3 de 08/04/2005; US 60/670,213 de 11/04/2005

(54) Título: ÁCIDO NUCLÉICO ESPECÍFICO, PARES DE INICIADORES, SONDAS, KITS E MÉTODOS PARA IDENTIFICAR O EVENTO ELITE A2704-12 EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS, CONFIRMAR A PUREZA DE SEMENTES E ANALISAR SEMENTES EM RELAÇÃO À PRESENÇA DO REFERIDO EVENTO ELITE

(73) Titular: BAYER CROPSOURCE NV, Sociedade Belga. Endereço: J. E. Mommaertslaan 14, BE-1831 DIEGEM, BÉLGICA(BE)

(72) Inventor: MARC DE BEUCKELEER

Código de Controle: 2FAE9770EBFF100E CC6B9D3F002791C2

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 02/05/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 02/05/2018

Assinado digitalmente por:
Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patente

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ÁCIDO NUCLEICO ESPECÍFICO, PARES DE INICIADORES, SONDAS, KITS E MÉTODOS PARA IDENTIFICAR O EVENTO ELITE A2704-12 EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS, CONFIRMAR A PUREZA DE SEMENTES E ANALISAR SEMENTES EM RELAÇÃO À PRESENÇA DO REFERIDO EVENTO ELITE"**.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a métodos e kits para identificar em amostras biológicas a presença de material de planta, que compreende, especificamente, o evento de transformação A2704-12, bem como plantas de soja transgênicas, material de planta e sementes que contêm esse evento. As plantas de soja da invenção combinam o fenótipo tolerante a herbicidas com uma eficiência agrônômica, estabilidade genética e adaptabilidade a fundamentos genéticos diferentes, equivalentes à linha de soja não transformada, na ausência de pressão por ervas daninhas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A expressão fenotípica de um transgene em uma planta é determinada tanto pela estrutura do próprio gene e por sua localização no genoma da planta. Ao mesmo tempo, a presença de transgene (em um DNA estranho) em diferentes localizações no genoma influencia o fenótipo total da planta de diferentes maneiras. A introdução agronomicamente ou industrialmente bem sucedida de uma característica comercialmente interessante em uma planta por manipulação genética pode ser um procedimento demorado, dependendo de diversos fatores. A transformação e regeneração *in situ* de plantas geneticamente transformadas são apenas a primeira em uma série de etapas de seleção, que incluem uma extensa caracterização genética, reprodução e avaliação em testes de campo, eventualmente levando à seleção de um evento de elite.

A identificação inequívoca de um evento de elite está se tornando crescentemente importante, em vista das discussões sobre Novos Alimentos/Forragem, separação de produtos GMO e não GMO e a identificação de material patentado. Idealmente, esse método de identificação é tanto rápido como simples, sem a necessidade de uma estrutura ampla de laboratório. Além disso, o método deve fornecer resultados que permitem a determinação inequívoca do evento de elite, sem interpretação do técnico, mas

que resiste a um exame por um técnico, caso necessário.

A2704-12 foi selecionado como um evento de elite no desenvolvimento de soja (*Glycine max*. L.) resistente a herbicida, Liberty®, por transformação da soja com um plasmídeo que compreende o gene de *pat* sintético, que codifica a tolerância a fosfinotricina e pode ser vendida comercialmente como soja Liberty Link®. No presente estão descritas as ferramentas para uso em métodos simples e inequívocos para identificar o evento de elite A2704-12 em amostras biológicas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção refere-se a métodos para identificar o evento de elite A2704-12 em amostras biológicas, métodos esses que estão baseados em iniciadores ou sondas que reconhecem especificamente a sequência flanqueadora 5' e/ou 3' de A2704-12.

Mais especificamente, a invenção refere-se a um método que
15 compreende a amplificação de uma sequência de ácido nucléico presente em amostras biológicas, usando uma reação em cadeia de polimerase com pelo menos dois iniciadores, um dos quais reconhece a região flanqueadora 5' ou 3' de A2704-12, o outro, que reconhece uma sequência dentro do DNA estranho, de preferência, para obter um fragmento de DNA de entre 100 e
20 500 bp. Os iniciadores podem reconhecer uma sequência dentro da região flanqueadora 5' de A2704-12 (SEQ ID NO: 1, da posição 1 à posição 209) ou dentro da região flanqueadora 3' de A2704-12 (complemento de SEQ ID NO: 2, da posição 569 à posição 1000) e uma sequência dentro do DNA estranho (complemento de SEQ ID NO: 1, da posição 210 a 720 ou SEQ ID NO: 2, da
25 posição 1 à posição 568), em cada caso. O iniciador que reconhece a região flanqueadora 5' pode compreender a sequência de nucleotídeo SEQ ID NO: 4 e o iniciador que reconhece uma sequência dentro do DNA estranho pode compreender a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 8, descrita no presente.

30 A presente invenção refere-se, mais especificamente, a um método para identificar o evento de elite A2704-12 em amostras biológicas, método esse que compreende amplificar uma sequência de um ácido nucléico

presente em uma amostra biológica, usando uma reação em cadeia com dois iniciadores com, em cada caso, a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 8, para obter um fragmento de DNA de cerca de 185 bp.

5 A presente invenção refere-se, ainda, às sequências flanqueadoras específicas de A2704-12 descritas no presente, que podem ser usadas para desenvolver métodos de identificação específicos para A2704-12 em amostras biológicas. Mais particularmente, a invenção refere-se às regiões flanqueadoras 5' e/ou 3' de A2704-12, que podem ser usada para o desenvolvimento de iniciadores e sondas específicos, tal como descrito adicionalmente no presente. A invenção refere-se, ainda, a métodos de identificação para a presença de A2704-12 em amostras biológicas, baseados no uso desses iniciadores ou sondas específicos. Os iniciadores podem consistir em uma sequência de nucleotídeo de 12 a cerca de 200 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 209 ou o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 569 ao nucleotídeo 1000, combinados com iniciadores que consistem em uma sequência de nucleotídeo de 17 a cerca de 200 nucleotídeos consecutivos, selecionados do complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 210 ao nucleotídeo 720 ou da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 569. Os iniciadores também podem compreender essas sequências de nucleotídeo localizadas em sua extremidade 3' extrema e compreender, ainda, sequências não relacionadas ou sequências derivadas das sequências de nucleotídeo mencionadas, mas compreendendo combinações imperfeitas.

A invenção refere-se, ainda, a kits para identificar o evento de elite A2704-12 em amostras biológicas, sendo que os referidos kits compreendem pelo menos um iniciador ou sonda que reconhece especificamente a região flanqueadora 5' ou 3' de A2704-12.

O kit da invenção pode compreender, além de um iniciador que reconhece especificamente a região flanqueadora 5' ou 3' de A2704-12, um

segundo iniciador, que reconhece especificamente uma sequência dentro do DNA estranho de A2704-12, para uso em um protocolo de identificação de PCR. De preferência, o kit da invenção compreende dois iniciadores específicos, um dos quais reconhece uma sequência dentro da região flanqueadora 5' de A2704-12, e o outro, que reconhece uma sequência dentro do DNA estranho. Especialmente o iniciador que reconhece a região flanqueadora 5', pode compreender a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 4 e o iniciador que reconhece o transgene pode compreender a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 8 ou qualquer outro iniciador, tal como descrito no presente.

A invenção refere-se, ainda, a um kit para identificar o evento de elite A2704-12 em amostras biológicas, sendo que o referido kit compreende os iniciadores de PCR, com a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 8, para uso no protocolo de identificação de PCR de A2704-12, descrito no presente.

A invenção também refere-se a um kit para identificar o evento de elite A2704-12 em amostras biológicas, sendo que o referido kit compreende uma sonda específica com uma sequência que corresponde (ou é complementar) à sequência com entre 80% e 100% de identidade de sequência com uma região específica de A2704-12. De preferência, a sequência da sonda corresponde a uma região específica que compreende parte da região flanqueadora 5' ou 3' de A2704-12. De modo especialmente preferido, a sonda específica tem ou é complementar a) uma sequência com entre 80% e 100% de identidade de sequência com a sequência entre os nucleotídeos 160 e 260 de SEQ ID NO: 1 ou a sequência entre os nucleotídeos 520 e 620 de SEQ ID NO: 2.

Os métodos e kits compreendidos pela presente invenção podem ser usados para fins diferentes, tais como, mas não limitados aos seguintes: para identificar a presença ou ausência de A2704-12 em plantas, material de planta ou em produtos tais como, mas não limitados a, produtos de alimentos ou forragem (frescos ou processados), que compreendem material de planta ou são derivados do mesmo; adicionalmente ou alternativa-

mente, os métodos kits da presente invenção podem ser usados para identificar material de plantas transgênicas pra fins de separação entre material transgênico e não transgênico; adicionalmente ou alternativamente, os métodos e kits da presente invenção podem ser usados para determinar a qualidade (isto é, percentagem de material puro) de material de planta, que
5 compreende A2704-12.

A invenção refere-se, ainda, às regiões flanqueadoras 5' e/ou 3' de A2704-12, bem como aos iniciadores e sondas específicos desenvolvidos das seqüências flanqueadoras 5' e/ou 3' de A2704-12.

10 A invenção também refere-se a plantas de soja, partes das mesmas, células, sementes e plantas de progênie, que compreendem o evento de elite A2704-12. Essas plantas, partes das mesmas, células, sementes e plantas de progênie podem ser identificadas usando os métodos tais como descritos no presente.

15 DESCRIÇÃO DETALHADA

A incorporação de uma molécula de DNA recombinante no genoma da planta tipicamente resulta da transformação de uma célula ou tecido (ou de outra manipulação genética). O local específico de incorporação deve-se ou a integração "aleatória" ou está em uma localização predeterminada (se for usado um processo de integração dirigida).
20

O DNA introduzido no genoma da planta como resultado da transformação de uma célula ou tecido da planta com um DNA recombinante ou "DNA de transformação", e que se origina dessa DNA de transformação, está referido doravante como "DNA estranho", que compreende um ou mais
25 "transgenes". "DNA da planta" no contexto da presente invenção refere-se a DNA que se origina da planta que está sendo transformada. O DNA de planta geralmente é encontrado no mesmo local genético na planta do tipo nativo correspondente. O DNA estranho pode ser caracterização pela localização e pela configuração no local da incorporação da molécula de DNA recombinante no genoma da planta. O local no genoma da planta onde o DNA re-
30 combinante foi inserido também é designado por "local de inserção" ou "local de alvo". A inserção de DNA recombinante no genoma da planta pode estar

associada a uma supressão de DNA de planta, designada como "supressão de local de alvo". Uma "região flanqueadora" ou "seqüência flanqueadora", tal como usada no presente, refere-se a uma seqüência de pelo menos 50 bp e até 5000 bp do genoma da planta, que está localizada ou imediatamente a montante do ou contígua a ou imediatamente a jusante de e contígua ao DNA estranho. Procedimentos de transformação, que levam à integração aleatória do DNA estranho resultam em produtos de transformação com regiões flanqueadoras diferentes, que são características e exclusivas para cada produto de transformação. Quando o DNA recombinante é introduzido em uma planta através de cruzamento tradicional, seu local de inserção no genoma da planta ou em suas regiões flanqueadoras geralmente não é modificado. Uma "região de inserção", tal como usada no presente, refere-se à região correspondente à região de pelo menos 40 bp, de preferência, pelo menos 100 bp, e até 10000 bp, abrangida pela seqüência que compreende a região flanqueadora a montante e/ou a jusante de um DNA estranho no genoma da planta. Levando em consideração pequenas diferenças devido a mutações dentro de uma espécie, uma região de inserção conserva, ao ser cruzada em uma planta da mesma espécie, pelo menos 85%, de preferência, 90%, de modo particularmente preferido, 95%, e, de modo especialmente preferido, 100% de identidade de seqüência com a seqüência que compreende as regiões flanqueadoras a montante e a jusante do DNA estranho na planta originalmente obtida por transformação.

Um evento é definido como um local genético (artificial) que, como resultado de engenharia genética, leva um transgene, que compreende pelo menos uma cópia de um gene de interesse. Os estados alélicos típicos de um evento são a presença ou ausência do DNA estranho. Um evento está caracterizado fenotipicamente pela expressão do transgene. Ao nível genético, um evento é parte da constituição genética de uma planta. Ao nível molecular, um evento pode estar caracterizado pelo mapa de restrição (por exemplo, tal como determinado por Southern blotting), pelas seqüências flanqueadoras a montante e/ou a jusante do transgene, a localização dos marcadores moleculares e/ou a configuração molecular do transgene. Nor-

malmente, a transformação de uma planta com um DNA de transformação, que compreende pelo menos um gene de interesse, leva a multiplicidade de eventos, cada um dos quais é exclusivo.

Um evento de elite, tal como usado no presente, é um evento
5 que é selecionado de um grupo de eventos, obtidos por transformação com o mesmo DNA de transformação ou por novo cruzamento com plantas obtidas por essa transformação, com base na expressão e estabilidade do(s) transgene(s) e sua compatibilidade com as características agrônômicas ótimas da planta que contém o mesmo. Desse modo, os critérios para a seleção do evento de elite são um ou mais, de preferência, dois ou mais vantajosamente, todos os seguintes:

- a) que a presença do DNA estranho não compromete outras características da planta, tais como as que referem-se à eficiência agrônômica ou valor comercial;
- 15 b) que o evento está caracterizado por uma configuração molecular bem definida, que é herdada estavelmente e para a qual podem ser desenvolvidas ferramentas apropriadas para controle de identidade;
- c) que o(s) gene(s) de interesse mostra(m) uma expressão fenotípica apropriada e espacial e temporalmente estável, tanto na condição heterozigótica (ou hemizigótica) e homozigótica do evento, a um nível comercialmente aceitável em uma variedade de condições ambientais às quais as plantas que levam o evento têm probabilidade de ser expostas no uso agrônômico comum.
- 20

É preferido que o DNA estranho esteja associado a uma posição
25 no genoma da planta que permite uma fácil introgressão nos fundamentos genéticos comerciais desejados.

O estado de um evento como um evento de elite é confirmado por introgressão do evento de elite em diferentes fundamentos genéticos relevantes e observando concordância com um, dois ou todos os critérios,
30 por exemplo, a), b) e c) acima.

Um "evento de elite" refere-se, portanto, a um local genético que compreende um DNA estranho, que satisfaz os critérios descritos acima.

Uma planta, material de planta ou progênie, tais como sementes, podem compreender um ou mais eventos de elite em seu genoma.

As ferramentas desenvolvidas para identificar um evento de elite ou a planta, material de planta que compreende um evento de elite, ou produtos que compreendem material de planta que compreende o evento de elite estão baseadas nas características genômicas específicas do evento de elite, tal como, um mapa de restrição específico da região genômica que compreende o DNA estranho, marcadores moleculares ou a sequência da região(ões) flanqueadora(s) do DNA estranho.

Quando uma ou as duas regiões flanqueadoras do DNA estranho tiverem sido seqüenciadas, iniciadores e sondas podem ser desenvolvidos, que reconhecem especificamente essa(s) seqüência(s) no ácido nucléico (DNA e RNA) de uma amostra por meio de uma técnica biológica molecular. Por exemplo, um método de PCR pode ser desenvolvido para identificar o evento de elite em amostras biológicas (tais como amostras de plantas, material de planta ou produtos que compreendem material de planta). Esse PCR está baseado em pelo menos dois "iniciadores" específicos, um que reconhece a seqüência dentro da região flanqueadora 5' ou 3' do evento de elite e o outro, que reconhece uma seqüência dentro do DNA estranho. Os iniciadores, de preferência, têm uma seqüência de entre 15 e 35 nucleotídeos, que, sob condições de PCR otimizadas, "reconhecem especificamente", em cada caso, uma seqüência dentro da região flanqueadora 5' ou 3' do evento de elite e do DNA estranho, de modo que um fragmento específico ("fragmento de integração" ou amplicon diferenciador) é amplificado de uma amostra de ácido nucléico que compreende o evento de elite. Isso significa que apenas o fragmento de integração dirigida, e nenhuma outra seqüência no genoma da planta ou DNA estranho, é amplificado sob condições de PCR otimizadas.

Iniciadores de PCR apropriados para a invenção podem ser os seguintes:

- oligonucleotídeos variando em comprimento de 17 nt a cerca de 210 nt, que compreendem uma seqüência de nucleotídeo de pelo menos

17 nucleotídeos consecutivos, de preferência, 20 nucleotídeos consecutivos escolhidos da sequência flanqueadora 5' (SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 1 a nucleotídeo 209), em sua extremidade 3' (iniciadores que reconhecem as sequências flanqueadoras 5'); ou

5 - oligonucleotídeos variando em comprimento de 17 nt a cerca de 450 nt, que compreendem uma sequência de nucleotídeo de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, de preferência, 20 nucleotídeos consecutivos escolhidos da sequência flanqueadora 3' (complemento de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 569 ao nucleotídeo 1000), em sua extremidade 3' (iniciadores
10 que reconhecem as sequências flanqueadoras 3'); ou

 - oligonucleotídeos variando em comprimento de 17 nt a cerca de 510 nt, que compreendem uma sequência de nucleotídeo de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, de preferência, 20 nucleotídeos consecutivos, escolhidos de sequências de DNA inseridas (complemento de SEQ ID NO:
15 1, do nucleotídeo 210 ao nucleotídeo 720) em sua extremidade (3') (iniciadores que reconhecem DNA estranho); ou

 - oligonucleotídeos variando em comprimento de 17 nt a cerca de 570 nt, que compreendem uma sequência de nucleotídeo de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, de preferência, 20 nucleotídeos consecutivos,
20 escolhidos de sequências de DNA inseridas (SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 569).

 Os iniciadores podem, naturalmente, ser mais compridos do que os 17 nucleotídeos consecutivos, e podem ter um comprimento de, por exemplo, 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 nt ou mesmo mais compridos.
25 Os iniciadores podem consistir inteiramente na sequência de nucleotídeo escolhida das sequências de nucleotídeos de sequências flanqueadoras e sequências de DNA estranho. Porém, a sequência de nucleotídeo dos iniciadores em sua extremidade 5' (isto é, fora dos 17 nucleotídeos consecutivos localizados em 3') é menos crítica. Desse modo, a sequência 5' dos iniciadores
30 res pode consistir em uma sequência de nucleotídeo escolhida das sequências flanqueadoras ou de DNA estranho, opcionalmente, mas podem conter diversas (por exemplo, 1, 2, 3, 10 combinações imperfeitas). A sequência 5'

dos iniciadores podem até mesmo consistir inteiramente de uma sequência de nucleotídeo não relacionada com as sequências flanqueadoras ou DNA estranho, tal como, por exemplo, uma sequência de nucleotídeo que representa locais de reconhecimento da enzima de restrição. Essas sequências não relacionadas ou sequências flanqueadoras de DNA com combinações imperfeitas, de preferência, não devem ter um comprimento maior que 100, de modo particularmente preferido, não maior que 50 ou até mesmo 25 nucleotídeos.

Além disso, iniciadores apropriados podem compreender ou consistir em uma sequência de nucleotídeo em sua extremidade 3' abrangendo a região de união entre as sequências derivadas do DNA da planta e as sequências de DNA estranho (localizadas nos nucleotídeos 209-210 na SEQ ID NO: 1 e os nucleotídeos 568-569 na SEQ ID NO: 2), desde que os 17 nucleotídeos consecutivos localizados em 3' não sejam derivados exclusivamente das sequências de DNA estranho ou derivadas de plantas em SEQ ID NO: 1 e 2.

Portanto, os iniciadores de PCR apropriados para a invenção também podem ser os seguintes:

- oligonucleotídeos variando em comprimento de 17 nt a cerca de 210 nt, que compreendem uma sequência de nucleotídeo de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, de preferência, 20 nucleotídeos consecutivos, escolhidos de

SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 215, em sua extremidade 3'; ou

- oligonucleotídeos variando em comprimento de 17 nt a cerca de 450 nt, que compreendem uma sequência de nucleotídeo de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, de preferência, 20 nucleotídeos consecutivos, escolhidos do complemento de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 554 ao nucleotídeo 1000, em sua extremidade 3'; ou

- oligonucleotídeos variando em comprimento de 17 nt a cerca de 510 nt, que compreendem uma sequência de nucleotídeo de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, de preferência, 20 nucleotídeos consecutivos,

escolhidos do complemento de SEQ ID NO: 1. do nucleotídeo 195 ao nucleotídeo 720) em sua extremidade 3'; ou

- oligonucleotídeos variando em comprimento de 17 nt a cerca de 570 nt, que compreendem uma sequência de nucleotídeo de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, de preferência, 20 nucleotídeos consecutivos, escolhidos de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 584.

Também fica imediatamente claro para o técnico experiente que pares de iniciadores de PCR escolhidos apropriadamente, também não compreendem seqüências complementares uma à outra.

- 10 Para os fins da invenção, o "complemento de uma seqüência de nucleotídeos representada na SEQ ID NO: X" é a seqüência de nucleotídeo que pode ser derivada da seqüência de nucleotídeo representada substituindo os nucleotídeos através de seus nucleotídeos complementares de acordo com as regras de Chargaff ($A \leftrightarrow T$; $G \leftrightarrow C$) e lendo a seqüência na direção 5' para 3', isto é, na direção oposta à representada na seqüência de nucleotídeo.

- Exemplos de iniciadores apropriados são as seqüências de oligonucleotídeo SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 (iniciadores que reconhecem a seqüência flanqueadora 5'), SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, 20 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 (iniciadores que reconhecem DNA estranho, para uso com os iniciadores que reconhecem a seqüência flanqueadora 5'), SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 (iniciadores que reconhecem DNA estranho, para uso com os iniciadores que reconhecem a seqüência flanqueadora 3'), SEQ 25 ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 ou SEQ ID NO: 19 (iniciadores que reconhecem a seqüência flanqueadora 3').

Outros exemplos de iniciadores de oligonucleotídeo apropriados compreendem em sua extremidade 3' as seguintes seqüências ou consistem nessas seqüências:

- 30 a. iniciadores que reconhecem a seqüência flanqueadora 5':
- a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 23 ao nucleotídeo 42

- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 68 ao nucleotídeo 87
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 69 ao nucleotídeo 88
- 5 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 134 ao nucleotídeo 153
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 22 ao nucleotídeo 42
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 10 30 ao nucleotídeo 49
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 67 ao nucleotídeo 87
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 70 ao nucleotídeo 88
- 15 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 76 ao nucleotídeo 95
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 78 ao nucleotídeo 97
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 20 133 ao nucleotídeo 152
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 21 ao nucleotídeo 42
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 31 ao nucleotídeo 49
- 25 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 34 ao nucleotídeo 63
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 66 ao nucleotídeo 87
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 30 68 ao nucleotídeo 88
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 73 ao nucleotídeo 92

- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 75 ao nucleotídeo 95
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 77 ao nucleotídeo 97
- 5 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 77 ao nucleotídeo 95
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 134 ao nucleotídeo 152
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 10 154 ao nucleotídeo 173
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 22 ao nucleotídeo 43
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 33 ao nucleotídeo 53
- 15 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 35 ao nucleotídeo 53
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 67 ao nucleotídeo 88
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 20 72 ao nucleotídeo 92
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 74 ao nucleotídeo 92
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 76 ao nucleotídeo 97
- 25 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 78 ao nucleotídeo 95
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 135 ao nucleotídeo 152
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 30 154 ao nucleotídeo 171
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 32 ao nucleotídeo 53

- a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 36 ao nucleotídeo 57
- a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 71 ao nucleotídeo 92
- 5 - a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 74 ao nucleotídeo 95
- a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 75 ao nucleotídeo 92
- a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 10 32 ao nucleotídeo 51
- a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 31 ao nucleotídeo 51
- a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 33 ao nucleotídeo 51
- 15 - a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 30 ao nucleotídeo 51
- a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 34 ao nucleotídeo 51
- a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 20 205 ao nucleotídeo 226
- b. iniciadores que reconhecem a seqüência de DNA estranho para uso com iniciadores que reconhecem a seqüência flanqueadora 5':
- o complemento da seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 201 ao nucleotídeo 220
- 25 - o complemento da seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 220 ao nucleotídeo 239
- o complemento da seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 361 ao nucleotídeo 380
- o complemento da seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 366 ao nucleotídeo 385
- 30 - o complemento da seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 201 ao nucleotídeo 219

- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 220 ao nucleotídeo 238
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 221 ao nucleotídeo 239
- 5 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 358 ao nucleotídeo 377
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 359 ao nucleotídeo 378
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 361 ao nucleotídeo 379
- 10 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 366 ao nucleotídeo 384
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 368 ao nucleotídeo 387
- 15 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 496 ao nucleotídeo 515
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 656 ao nucleotídeo 675
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 201 ao nucleotídeo 218
- 20 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 220 ao nucleotídeo 237
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 221 ao nucleotídeo 238
- 25 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 220 ao nucleotídeo 240
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 221 ao nucleotídeo 240
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 251 ao nucleotídeo 270
- 30 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 252 ao nucleotídeo 271

- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 253 ao nucleotídeo 272
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 359 ao nucleotídeo 377
- 5 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 361 ao nucleotídeo 378
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 359 ao nucleotídeo 379
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 361 ao nucleotídeo 382
- 10 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 366 ao nucleotídeo 383
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 368 ao nucleotídeo 386
- 15 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 366 ao nucleotídeo 386
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 375 ao nucleotídeo 393
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 375 ao nucleotídeo 394
- 20 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 496 ao nucleotídeo 514
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 498 ao nucleotídeo 515
- 25 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 562 ao nucleotídeo 581
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 608 ao nucleotídeo 627
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 651 ao nucleotídeo 670
- 30 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 655 ao nucleotídeo 674

- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 656 ao nucleotídeo 674
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 656 ao nucleotídeo 676
- 5 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 669 ao nucleotídeo 678
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 252 ao nucleotídeo 270
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 253 ao nucleotídeo 271
- 10 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 251 ao nucleotídeo 271
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 252 ao nucleotídeo 272
- 15 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 267 ao nucleotídeo 286
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 359 ao nucleotídeo 376
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 358 ao nucleotídeo 379
- 20 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 362 ao nucleotídeo 379
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 359 ao nucleotídeo 380
- 25 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 368 ao nucleotídeo 385
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 368 ao nucleotídeo 388
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 375 ao nucleotídeo 392
- 30 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 376 ao nucleotídeo 393

- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 376 ao nucleotídeo 394
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 376 ao nucleotídeo 395
- 5 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 400 ao nucleotídeo 459
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 442 ao nucleotídeo 461
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 496 ao nucleotídeo 513
- 10 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 556 ao nucleotídeo 575
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 558 ao nucleotídeo 577
- 15 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 561 ao nucleotídeo 580
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 563 ao nucleotídeo 582
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 562 ao nucleotídeo 582
- 20 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 608 ao nucleotídeo 628
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 637 ao nucleotídeo 656
- 25 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 651 ao nucleotídeo 669
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 651 ao nucleotídeo 671
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 656 ao nucleotídeo 673
- 30 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 655 ao nucleotídeo 675

- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 659 ao nucleotídeo 677
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 659 ao nucleotídeo 679
- 5 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 201 ao nucleotídeo 222
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 204 ao nucleotídeo 225
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 223 ao nucleotídeo 240
- 10 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 223 ao nucleotídeo 241
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 220 ao nucleotídeo 241
- 15 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 221 ao nucleotídeo 241
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 253 ao nucleotídeo 270
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 251 ao nucleotídeo 272
- 20 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 252 ao nucleotídeo 273
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 253 ao nucleotídeo 274
- 25 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 268 ao nucleotídeo 289
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 377 ao nucleotídeo 374
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 375 ao nucleotídeo 395
- 30 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 440 ao nucleotídeo 458

- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 442 ao nucleotídeo 460
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 440 ao nucleotídeo 460
- 5 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 442 ao nucleotídeo 462
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 492 ao nucleotídeo 513
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 503 ao nucleotídeo 522
- 10 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 556 ao nucleotídeo 574
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 556 ao nucleotídeo 576
- 15 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 562 ao nucleotídeo 579
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 563 ao nucleotídeo 581
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 563 ao nucleotídeo 583
- 20 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 562 ao nucleotídeo 583
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 608 ao nucleotídeo 625
- 25 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 608 ao nucleotídeo 629
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 644 ao nucleotídeo 662
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 651 ao nucleotídeo 668
- 30 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 651 ao nucleotídeo 672

- 31
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 655 ao nucleotídeo 676
 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 655 ao nucleotídeo 677
 - 5 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 659 ao nucleotídeo 680
 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 657 ao nucleotídeo 688
 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 223 ao nucleotídeo 242
 - 10 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 267 ao nucleotídeo 288
 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 368 ao nucleotídeo 389
 - 15 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 375 ao nucleotídeo 396
 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 376 ao nucleotídeo 397
 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 440 ao nucleotídeo 457
 - 20 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 442 ao nucleotídeo 459
 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 442 ao nucleotídeo 463
 - 25 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 534 ao nucleotídeo 553
 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 558 ao nucleotídeo 575
 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 556 ao nucleotídeo 577
 - 30 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 563 ao nucleotídeo 580

- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 563 ao nucleotídeo 584
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 644 ao nucleotídeo 661
- 5 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 645 ao nucleotídeo 662
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 644 ao nucleotídeo 665
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 645 ao nucleotídeo 666
- 10 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 325 ao nucleotídeo 342
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 503 ao nucleotídeo 520
- 15 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 534 ao nucleotídeo 554
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 221 ao nucleotídeo 242
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 505 ao nucleotídeo 522
- 20 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 534 ao nucleotídeo 551
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 534 ao nucleotídeo 555
- 25 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 536 ao nucleotídeo 557
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 551 ao nucleotídeo 570
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 551 ao nucleotídeo 571
- 30 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 551 ao nucleotídeo 572

- c. iniciadores que reconhecem a sequência de DNA estranho para uso com iniciadores que reconhecem a sequência flanqueadora 3'
- o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 955 ao nucleotídeo 974
 - 5 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 955 ao nucleotídeo 973
 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 955 ao nucleotídeo 972
 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 958 ao nucleotídeo 975
 - 10 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 958 ao nucleotídeo 977
 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 917 ao nucleotídeo 934
 - 15 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 947 ao nucleotídeo 968
 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 951 ao nucleotídeo 972
 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 958 ao nucleotídeo 976
 - 20 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 955 ao nucleotídeo 976
 - o complemento da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 958 ao nucleotídeo 979
 - 25 d. iniciadores que reconhecem a sequência flanqueadora 3':
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 151 ao nucleotídeo 170
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 152 ao nucleotídeo 171
 - 30 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 6 ao nucleotídeo 25
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo

- 148 ao nucleotídeo 167
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 151 ao nucleotídeo 171
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 152 ao nucleotídeo 170
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 153 ao nucleotídeo 171
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 5 ao nucleotídeo 25
- 10 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 7 ao nucleotídeo 25
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 67 ao nucleotídeo 86
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 89 ao nucleotídeo 108
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 134 ao nucleotídeo 153
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 147 ao nucleotídeo 167
- 20 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 152 ao nucleotídeo 171
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 150 ao nucleotídeo 171
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 153 ao nucleotídeo 170
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 154 ao nucleotídeo 171
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 168 ao nucleotídeo 187
- 25 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 169 ao nucleotídeo 187
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo

- 171 ao nucleotídeo 190
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 197 ao nucleotídeo 216
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 236 ao nucleotídeo 255
- 5
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 280 ao nucleotídeo 299
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 4 ao nucleotídeo 25
- 10
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 8 ao nucleotídeo 25
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 63 ao nucleotídeo 82
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 66 ao nucleotídeo 86
- 15
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 68 ao nucleotídeo 87
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 90 ao nucleotídeo 108
- 20
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 93 ao nucleotídeo 112
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 94 ao nucleotídeo 113
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 96 ao nucleotídeo 115
- 25
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 101 ao nucleotídeo 120
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 134 ao nucleotídeo 164
- 30
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 146 ao nucleotídeo 167
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo

- 150 ao nucleotídeo 167
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 170 ao nucleotídeo 190
- 5 172 ao nucleotídeo 190
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 186 ao nucleotídeo 205
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 189 ao nucleotídeo 208
- 10 190 ao nucleotídeo 209
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 191 ao nucleotídeo 210
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 195 ao nucleotídeo 214
- 15 196 ao nucleotídeo 216
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 196 ao nucleotídeo 214
- 20 199 ao nucleotídeo 216
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 208 ao nucleotídeo 227
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 234 ao nucleotídeo 253
- 25 235 ao nucleotídeo 255
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 279 ao nucleotídeo 299
- 30 281 ao nucleotídeo 299
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo

- 285 ao nucleotídeo 304
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 296 ao nucleotídeo 315
- 5 396 ao nucleotídeo 415
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 64 ao nucleotídeo 82
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 65 ao nucleotídeo 86
- 10 67 ao nucleotídeo 87
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 75 ao nucleotídeo 92
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 91 ao nucleotídeo 108
- 15 92 ao nucleotídeo 112
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 93 ao nucleotídeo 113
- 20 94 ao nucleotídeo 112
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 95 ao nucleotídeo 115
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 95 ao nucleotídeo 113
- 25 97 ao nucleotídeo 115
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 100 ao nucleotídeo 120
- 30 132 ao nucleotídeo 153
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo

- 133 ao nucleotídeo 154
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 163 ao nucleotídeo 182
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 165 ao nucleotídeo 184
5 280 ao nucleotídeo 299
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 167 ao nucleotídeo 187
10 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 169 ao nucleotídeo 190
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 173 ao nucleotídeo 190
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 187 ao nucleotídeo 205
15 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 189 ao nucleotídeo 209
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 190 ao nucleotídeo 210
20 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 190 ao nucleotídeo 208
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 191 ao nucleotídeo 209
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 192 ao nucleotídeo 210
25 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 194 ao nucleotídeo 214
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 197 ao nucleotídeo 214
30 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 233 ao nucleotídeo 253
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo

- 234 ao nucleotídeo 255
 - a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 235 ao nucleotídeo 253
- 5 282 ao nucleotídeo 299
 - a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 295 ao nucleotídeo 315
 - a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 297 ao nucleotídeo 315
- 10 397 ao nucleotídeo 415
 - a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 65 ao nucleotídeo 82
 - a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 66 ao nucleotídeo 87
 - a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 75 ao nucleotídeo 96
 - a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 91 ao nucleotídeo 112
- 20 92 ao nucleotídeo 112
 - a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 94 ao nucleotídeo 115
 - a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 95 ao nucleotídeo 112
- 25 99 ao nucleotídeo 120
 - a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 162 ao nucleotídeo 182
- 30 164 ao nucleotídeo 182
 - a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo

- 164 ao nucleotídeo 184
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 164 ao nucleotídeo 184
- 5 184 ao nucleotídeo 205
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 187 ao nucleotídeo 208
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 188 ao nucleotídeo 205
- 10 188 ao nucleotídeo 209
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 189 ao nucleotídeo 210
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 191 ao nucleotídeo 208
- 15 191 ao nucleotídeo 208
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 192 ao nucleotídeo 209
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 193 ao nucleotídeo 214
- 20 205 ao nucleotídeo 212
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 232 ao nucleotídeo 253
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 236 ao nucleotídeo 253
- 25 236 ao nucleotídeo 253
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 242 ao nucleotídeo 261
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 278 ao nucleotídeo 299
- 30 283 ao nucleotídeo 304
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo

- 287 ao nucleotídeo 304
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 294 ao nucleotídeo 315
- 5 298 ao nucleotídeo 315
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 398 ao nucleotídeo 415
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 161 ao nucleotídeo 182
- 10 163 ao nucleotídeo 184
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 165 ao nucleotídeo 182
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 166 ao nucleotídeo 187
- 15 241 ao nucleotídeo 261
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 243 ao nucleotídeo 261
- 20 244 ao nucleotídeo 261
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 240 ao nucleotídeo 261
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 126 ao nucleotídeo 145
- 25 208 ao nucleotídeo 225
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 124 ao nucleotídeo 145
- 30 75 ao nucleotídeo 94
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo

- 231 ao nucleotídeo 250
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 243 ao nucleotídeo 262
- 5 230 ao nucleotídeo 250
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 232 ao nucleotídeo 250
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 242 ao nucleotídeo 262
- 10 244 ao nucleotídeo 262
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 229 ao nucleotídeo 250
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 241 ao nucleotídeo 262
- 15 245 ao nucleotídeo 262
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 288 ao nucleotídeo 306
- 20 230 ao nucleotídeo 247
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 285 ao nucleotídeo 306
 - a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 289 ao nucleotídeo 306
- 25 282 ao nucleotídeo 303
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 288 ao nucleotídeo 307
- 30 287 ao nucleotídeo 307
- a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo

289 ao nucleotídeo 307

- a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 286 ao nucleotídeo 307

5 290 ao nucleotídeo 307

- a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 229 ao nucleotídeo 248

- a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 230 ao nucleotídeo 248

10 - a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 227 ao nucleotídeo 248

- a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 231 ao nucleotídeo 248

15 Tal como usado no presente, "a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID No: Z, da posição X à posição Y" indica que a seqüência de nucleotídeo que inclui os dois pontos terminais.

20 De preferência, o fragmento de integração tem um comprimento de entre 50 e 500 nucleotídeos, de modo especialmente preferido, entre 100 e 350 nucleotídeos. Os iniciadores específicos podem ter uma seqüência que é entre 80 e 100% idêntica, em cada caso, a uma seqüência dentro da região flanqueadora 5' ou 3' do evento de elite e ao DNA estranho do evento de elite, desde que as combinações imperfeitas ainda permitam uma identificação específica do evento de elite com esses iniciadores sob condições de PCR otimizadas. Mas, os limites de combinações imperfeitas admissíveis

25 podem ser facilmente determinados experimentalmente e são conhecidos de alguém versado na técnica.

A tabela abaixo exemplifica os tamanhos de amplicons de DNA (ou fragmentos de integração) esperados com pares selecionados de iniciadores de PCR.

Iniciador 1	Da posição	Iniciador 2	Até a posição	Comprimento do amplicon
HCA148	12	KVM174	225	213
HCA148	12	KVM177	253	241
HCA148	12	DPA024	316	304
HCA148	12	MDB390	396	384
HCA148	12	HCA023	511	499
HCA148	12	DPA007	634	622
DPA021	134	KVM174	225	91
DPA021	134	KVM177	253	119
DPA021	134	DPA024	316	182
DPA021	134	MDB390	396	262
DPA021	134	HCA023	511	377
DPA021	134	DPA007	634	500
KVM176	187	KVM174	225	38
KVM176	187	KVM177	253	66
KVM176	187	DPA024	316	129
KVM176	187	MDB390	396	209
KVM176	187	HCA023	511	324
KVM176	187	DPA007	634	447
YTP007	116	HCA074	628	512
YTP007	116	SMO017	667	551
YTP007	116	SMO027	710	594
YTP007	116	SMO033	867	751
MDB452	187	HCA074	628	441
MDB452	187	SMO017	667	480
MDB452	187	SMO027	710	523
MDB452	187	SMO033	867	680
HCA014	398	HCA074	628	230
HCA014	398	SMO017	667	269
HCA014	398	SMO027	710	312
HCA014	398	SMO033	867	469
MDB402	528	HCA074	628	100
MDB402	528	SMO017	667	139
MDB402	528	SMO027	710	182
MDB402	528	SMO033	867	339

A detecção dos fragmentos de integração pode ocorrer de diversas maneiras, por exemplo, por estimativa de tamanho depois de análise por gel. Os fragmentos de integração também podem ser seqüenciados diretamente. Outros métodos específicos de seqüência para detecção de fragmentos de DNA amplificados também são conhecidos na técnica.

Como a seqüência dos iniciadores e sua localização relativa no genoma são exclusivos para o evento de elite, a amplificação do fragmento de integração ocorre apenas em amostras biológicas que compreendem (o ácido nucléico) do evento de elite. De preferência, ao realizar uma PCR para identificar a presença de A2704-12 em amostras desconhecidas, está incluído um controle de um conjunto de iniciadores com os quais um fragmento dentro de um "gene de seqüência conservada" da espécie de planta do evento pode ser amplificado. Genes de seqüência conservada são genes que estão expressos na maioria dos tipos de células e que estão relacionados às atividades metabólicas básicas comuns a todas as células. De preferência, o fragmento amplificado do gene de seqüência conservada é um fragmento que é maior do que o fragmento de integração amplificado. Dependendo das amostras a ser analisadas, outros controles podem estar incluídos.

Protocolos de PCR estão descritos na técnica, tal como "PCR Applications Manual" (Roche Molecular Biochemicals, 2nd Edition, 1999). As condições ótimas para o PCR, incluindo a seqüência dos iniciadores específicos, estão especificadas em um "PCR identification protocol" para cada evento de elite. Mas é entendido que o número de parâmetros no protocolo de identificação de PCR pode precisar ser ajustado a condições específicas de laboratório e podem ser ligeiramente modificados para obter resultados similares. Por exemplo, o uso de um método diferente para preparação de DNA pode necessitar de ajuste, por exemplo, da quantidade de iniciadores, condições de polimerase e "annealing" usadas. Analogamente, a seleção de outros iniciadores pode determinar outras condições ótimas para o protocolo de identificação de PCR. Esses ajustes, porém, são evidentes para alguém versado na técnica e, além disso, estão detalhados em manuais de aplicação de PCR atuais, tal como o citado acima.

Alternativamente, iniciadores específicos podem ser usados para amplificar um fragmento de integração que pode ser usado como uma "sonda específica" para identificar A2704-12 em amostras biológicas. Pôr um ácido nucléico de uma amostra biológica em contato com a sonda, sob condições que permitem hibridização da sonda com seu fragmento correspondente no ácido nucléico, resulta na formação de um híbrido de ácido nucléico/sonda. A formação desse híbrido pode ser detectada (por exemplo, marcando o ácido nucléico ou a sonda), com o que a formação desse híbrido indica a presença de A2704-12. Esses métodos de identificação, baseados na hibridização com uma sonda específica (quer em um veículo de fase sólida ou em solução) têm sido descritos na técnica. A sonda específica é, de preferência, uma seqüência que, sob condições otimizadas, se hibridiza especificamente em uma região dentro da região flanqueadora 5' ou 3' do evento de elite e, de preferência, também compreende parte do DNA estranho contíguo à mesma (doravante designada como "região específica"). De preferência, a sonda específica compreende uma seqüência de entre 50 e 500 bp, de preferência, de 100 a 350 bp, que é pelo menos 80%, De preferência, entre 80 e 85%, de modo particularmente preferido, entre 85 e 90%, de modo especialmente preferido, entre 95% e 100% idêntica (ou complementar) à seqüência de nucleotídeo de uma região específica. De preferência, a sonda específica compreende uma seqüência de cerca de 15 a cerca de 100 nucleotídeos contíguos idênticos (ou complementares) a uma região específica do evento de elite.

Um "kit", tal como usado no presente, refere-se a um conjunto de reagentes para a finalidade de realizar o método da invenção, mais particularmente, a identificação do evento de elite A2704-12 em amostras biológicas. Mais particularmente, uma modalidade preferida do kit da invenção compreende pelo menos um ou dois iniciadores específicos, tal como descrito acima. Opcionalmente, o kit pode compreender, ainda, qualquer outro reagente descrito no presente no protocolo de identificação de PCR. Alternativamente, de acordo com outra modalidade desta invenção, o kit pode compreender uma sonda específica, tal como descrita acima, que se hibridiza

especificamente com ácido nucléico de amostras biológicas para identificar a presença de A2704-12 nas mesmas. Opcionalmente, o kit pode compreender, ainda, qualquer outro reagente (tal como, mas não limitado a tampão de hibridização, marcador) para identificação de A2704-12 em amostras biológicas, usando a sonda específica.

O kit da invenção pode ser usado, e seus componentes podem ser ajustados especificamente, para fins de controle de qualidade (por exemplo, pureza de lotes de sementes), detecção do evento de elite em material de planta ou material que compreende ou é derivado de material de planta, tal como, mas não limitado a, produtos de alimentação ou de forragem.

Tal como usado no presente, "identidade de seqüência", com relação a seqüências de nucleotídeo (DNA ou RNA), refere-se ao número de posições com nucleotídeos idênticos, dividido pelo número de nucleotídeos na mais curta de duas seqüências. O alinhamento das duas seqüências de nucleotídeo é realizada pelo algoritmo de Wilbur e Lipmann (Wilbur and Lipmann, 1983, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:726), usando um tamanho de janela de 20 nucleotídeos, um comprimento de palavra de 4 nucleotídeos e uma perda de lacuna de 4. Uma análise e interpretação auxiliadas por computador de dados de seqüência, inclusive alinhamento de seqüência, tal como descrito acima, pode ser realizadas convenientemente, por exemplo, usando os programas de IntelligeneticsTM Suíte (Intelligenetics Inc., CA) ou o pacote de software de análise de seqüência do Genetics Computer Group (GCG, University of Wisconsin, Biotechnology Center). As seqüências estão indicadas como "essencialmente similares" quando essas seqüência tem uma identidade de seqüência de pelo menos cerca de 75%, particularmente, pelo menos cerca de 80%, mais particularmente, pelo menos cerca de 85%, destacadamente, cerca de 90%, especialmente, cerca de 95%, mais especialmente, cerca de 100%. Fica claro que quando se diz que seqüências de RNA são essencialmente similares ou têm um determinado grau de identidade de seqüência com seqüências de DNA, a timidina (T) na seqüência de DNA é considerada igual a uracila (U) na seqüência de RNA.

O termo "iniciador", tal como usado no presente, abrange qual-

quer ácido nucléico que é capaz de iniciar a síntese de um ácido nucléico nascente em um processo dependente de gabarito, tal como PCR. Tipicamente, iniciadores são oligonucleotídeos de 10 a 30 nucleotídeos, mas podem ser usadas seqüências mais compridas. Os iniciadores podem ser obtidos em forma de filete duplo, embora a forma de filete único seja preferida. As sondas podem ser usadas como iniciadores, mas estão destinadas a ligar-se ao DNA ou RNA de alvo e não precisam ser usadas em um processo de amplificação.

O termo "reconhecem", tal como usado no presente ao referir-se a iniciadores específicos, refere-se ao fato de que os iniciadores específicos hibridizam-se especificamente em uma seqüência de ácido nucléico no evento de elite, sob as condições especificadas no método (tais como as condições do protocolo de identificação de PCR), sendo que a especificidade é determinada pela presença de controles positivos e negativos.

O termo "hibridizar-se", tal como usado no presente ao referir-se a sondas específicas, refere-se ao fato de que a sonda liga-se a uma região específica na seqüência de ácido nucléico do evento de elite sob as condições rigorosas usuais. Condições rigorosas usuais, tal como usado no presente, refere-se às condições para hibridização descritas no presente ou às condições de hibridização convencionais, tais como descritas por Sambrook et al. 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY), que pode compreender, por exemplo, as seguintes etapas: 1) imobilizar fragmento de DNA genômico de planta sobre um filtro, 2) pré-hibridizar o filtro por 1 a 2 horas, a 42°C, em 50% de formamida, 5 X SSPE, 2 X reagente de Denhardt e 0,1% de SDS, 3) adicionar a sonda de hibridização que foi marcada, 4) incubar por 16 a 24 horas, 5) lavar o filtro por 20 min, à temperatura ambiente, em 1 X SSC, 0,1% de SDS, 6) lavar o filtro três vezes por 20 min a cada vez, a 68°C, em 0,2 X SSC, 0,1% de SDS, e 7) expor o filtro por 24 a 48 horas a um filme de raios X, a -70°C, com uma tela intensificadora.

Tal como usadas no presente, amostras biológicas são uma amostra de uma planta, material de planta ou produtos que compreendem

material de planta. O termo "planta" destina-se a compreender tecidos de planta de soja (*Glycine max*), em qualquer estágio de maturidade, bem como quaisquer células, tecidos ou órgãos tirados de ou derivados de qualquer uma dessas plantas, incluindo, sem limitação, quaisquer sementes, folhas, 5 hastes, flores, raízes, células isoladas, gametas, culturas de células, culturas de tecidos ou protoplastos. "Material de planta", tal como usado no presente, refere-se a material que é obtido ou derivado de uma planta. Produtos que compreendem material de planta referem-se a alimentos, forragens ou outros produtos que são produzidos usando material de planta ou que podem 10 estar contaminados por material de planta. Entende-se que, no contexto da presente invenção, essas amostras biológicas são testadas em relação à presença de ácidos nucleicos específicos para A2704-12, implicando na presença de ácidos nucleicos nas amostras. Desse modo, os métodos referidos no presente para identificar o evento de elite A2704-12 em amostras biológicas 15 referem-se à identificação em amostras biológicas de ácidos nucleicos que compreendem o evento de elite.

Tal como usado no presente, "compreendem" deve ser interpretado como especificando a presença das características, integrantes, etapas, reagentes ou componentes, tais como referidos, não exclui a presença ou 20 adição de uma ou mais características, integrantes, etapas ou componentes, ou grupos dos mesmos. Desse modo, por exemplo, um ácido nucleico ou proteína que compreende uma sequência de nucleotídeos ou aminoácidos, pode compreender mais nucleotídeos ou aminoácidos do que os efetivamente citados, isto é, incorporados em um ácido nucleico ou proteína maior. Um 25 gene quimérico que compreende uma sequência de DNA que está definida funcionalmente ou estruturalmente, pode compreender sequências de DNA adicionais etc.

A presente invenção também refere-se ao desenvolvimento de um evento de elite A2704-12 na soja para as plantas que compreendem esse 30 evento, a progênie obtida dessas plantas e para outras células de plantas ou material de planta derivado desse evento. Plantas que compreendem o evento de elite A2704-12 foram obtidas tal como descrito no exemplo 1.

Plantas de soja ou material de planta que compreende A2704-12 podem ser identificadas de acordo com o protocolo de identificação de PCR descrito para A2704-12 no exemplo 2. Em resumo, DNA genômico de soja, presente na amostra biológica, é amplificado por PCR usando um iniciador que reconhece especificamente uma sequência dentro da sequência flanqueadora 5' ou 3' de A2704-12, tal como o iniciador com a sequência de SEQ ID NO: 4, e um iniciador que reconhece uma sequência no DNA estranho, tal como o iniciador com a sequência de SEQ ID NO: 8. Iniciadores de DNA, que amplificam parte de uma sequência de soja endógena são usados como controle positivo para a amplificação de PCR. Se na amplificação de PCR o material produzir um fragmento do tamanho esperado, o material contém material de planta de uma planta de soja que inclui o evento de elite A2704-12.

Plantas que incluem A2704-12 estão caracterizadas por sua tolerância a glufosinato, que no contexto da presente invenção inclui aquelas plantas que são tolerantes ao herbicida Liberty®. A tolerância a Liberty® pode ser testada de diferentes modo. O método de pintura de folha, tal como descrito no presente, é muito útil, quando é necessária a diferenciação entre plantas resistentes e sensíveis, sem matar as plantas sensíveis. Alternativamente, a tolerância pode ser testada por aplicação por pulverização de Liberty®. Tratamento por pulverização devem ser feito entre os estágios de folhas V3 e V4, para obter os melhores resultado. Plantas tolerantes estão caracterizadas pelo fato de que a pulverização de plantas com pelo menos 200 gramas de ingrediente ativo/hectare (g.a.i./há), de preferência, 400 g.a.i./há, e, possivelmente, até 1600 g.a.i./há (4X o índice normal de campo), não mata as plantas. Uma aplicação por aspersão livre deve ser aplicada a um índice de 793,79-963,88 g (28-34 oz) de Liberty®. O melhor é aplicar um volume de 75,72 litros (20 galões) de água por acre, usando um bocal do tipo de leque plano, tomando cuidado para não dirigir aplicações de pulverização diretamente no verticilo das plantas para evitar a queimadura de tensoativo nas folhas. O efeito herbicida deve aparecer dentro de 48 horas e ser claramente visível dentro de 5-7 dias.

Plantas que incluem A2704-12 podem ainda estar caracterizadas pela presença em suas células de transferase de acetil fosfinotricina, tal como determinado por um teste de PAT (De Block et al., 1987).

Plantas que incluem A2704-12 também estão caracterizadas por ter características agronômicas que são comparáveis a variedades de soja disponíveis comercialmente nos Estados Unidos, na ausência de pressão de ervas daninhas e uso de Liberty® para controle de ervas daninhas. Foi observado que a presença de um DNA estranho na região de inserção do genoma de planta de soja, descrita no presente, confere características fenotípicas e moleculares particularmente interessantes às plantas que contêm esse evento. Mais especificamente, a presença do DNA estranho nessa região específica no genoma dessas plantas, resulta em plantas que apresentam uma expressão fenotípica estável do gene de interesse, sem comprometer significativamente qualquer aspecto da eficiência agronômica das plantas.

Os seguintes exemplos descrevem a identificação do desenvolvimento de ferramentas para a identificação do evento de elite A2704-12 em amostras biológicas.

A não ser quando indicado de outro modo, todas as técnicas de DNA recombinante são realizadas de acordo com protocolos usuais, tais como descritos em Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY e nos volumes 1 e 2 de Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, USA. Materiais e métodos usuais para trabalho molecular com plantas estão descritos em Plant Molecular Biology Labfax (1993) por R.D.D. Croy, publicado por BIOS Scientific Publications Ltd (UK) e Blackwell Scientific Publications, UK.

Na descrição e exemplos, é feita referência às seguintes seqüências:

- | | |
|--------------|--|
| SEQ ID NO: 1 | seqüência de nucleotídeo que compreende uma região |
| 30 | flanqueadora 5' de A2704-12 |
| SEQ ID NO: 2 | seqüência de nucleotídeo que compreende uma região |
| | flanqueadora 3' de A2704-12 |

- SEQ ID NO: 3: iniciador HCA148
 SEQ ID NO: 4: iniciador DPA021
 SEQ ID NO: 5: iniciador KVM176
 SEQ ID NO: 6: iniciador KVM174
 5 SEQ ID NO: 7: iniciador KVM177
 SEQ ID NO: 8: iniciador DPA024
 SEQ ID NO: 9: iniciador MDB390
 SEQ ID NO: 10: iniciador HCA023
 SEQ ID NO: 11: iniciador DPA007
 10 SEQ ID NO: 12: iniciador YTP007
 SEQ ID NO: 13: iniciador MDB452
 SEQ ID NO: 14: iniciador HCA014
 SEQ ID NO: 15: iniciador MDB402
 SEQ ID NO: 16: iniciador HCA074
 15 SEQ ID NO: 17: iniciador SMO017
 SEQ ID NO: 18: iniciador SMO027
 SEQ ID NO: 19: iniciador SMO033
 SEQ ID NO: 20: iniciador 1 para amplificação do fragmento de controle
 SEQ ID NO: 21: iniciador 2 para amplificação do fragmento de controle

20 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Os exemplos seguintes, que não pretendem limitar as modalidades específicas descritas na invenção, podem ser entendidos em conjunto com o desenho anexo, incorporado ao presente por referência, no qual:

25 Figura 1: Representação esquemática da relação entre as seqüências de nucleotídeo e iniciadores citados. Barra preta: DNA estranho; barra clara: DNA de origem vegetal; os números abaixo das barras representam posições dos nucleotídeos; (c) refere-se ao complemento da seqüência de nucleotídeo indicada.

30 Figura 2: Protocolo de identificação de PCR desenvolvido para A2704-12. Coluna 1: amostra de DNA de plantas de soja que compreendem o evento transgênico A2704-12; coluna 2: amostra de DNA de uma planta de soja transgênica que não compreende o evento de elite A2704-12; coluna 3:

amostras de DNA de controle de plantas de soja do tipo nativo; coluna 4: sem controle de gabarito; coluna 5: marcador de peso molecular.

EXEMPLOS

1. Identificação das regiões flangeadoras do evento de elite A2704-12

5 Soja resistente a herbicida foi desenvolvida por transformação de soja com um vetor que compreende a sequência codificadora de um gene de *pat*, que codifica a enzima transferase de fosfinotricina, sob o controle do promotor 35S constitutivo do vírus de mosaico de couve-flor.

10 O evento de elite A2704-12 foi selecionado com base em um amplo procedimento de seleção baseado na boa expressão e estabilidade do gene de resistência a herbicida e sua compatibilidade com características agronômicas ótimas.

15 A sequência das regiões flangeadoras do DNA estranho no evento A2704-12 foi determinada usando o método térmico, assimétrico, entrelaçado de (TAIL) PCR, descrito por Liu et al. (1995, Plant J. 8(3): 457-463). Esse método utiliza três iniciadores alojados em reações sucessivas, junto com um iniciador degenerado, arbitrário, mais curto, de modo que as eficiências de amplificação relativas de produtos específicos e não específicos podem ser termicamente controladas. Os iniciadores específicos foram
20 selecionados por unir-se (anneal) na borda do DNA estranho e baseados em suas condições de união (annealing). Uma pequena quantidade (5 µl) de produtos de PCR secundários e terciários, não purificados, foi analisada em um gel de agarose de 1%. O produto de PCR terciário foi usado para amplificação preparativa, purificado e seqüenciado em um seqüenciador automático, usando o kit de ciclo DyeDeoxy Terminator.
25

1.1. Região flangeadora direita (5')

30 O fragmento identificado como compreendendo a região flangeadora 5', obtida pelo método de TAIL-PCR foi completamente seqüenciado (SEQ ID NO: 1). A sequência entre os nucleotídeos 1 e 209 corresponde ao DNA de planta, enquanto a sequência entre os nucleotídeos 210 e 720 corresponde ao DNA estranho.

1.2. Região flanqueadora esquerda (3')

O fragmento identificado como compreendendo a região flanqueadora 3', obtida pelo método de TAIL-PCR foi completamente seqüenciado (SEQ ID NO: 2). A seqüência entre os nucleotídeos 1 e 568 corresponde ao DNA estranho, enquanto a seqüência entre os nucleotídeos 569 e 1000 corresponde ao DNA de planta.

2. Desenvolvimento de um protocolo de identificação de reação em cadeia de polimerase

2.1 Iniciadores

Iniciadores específicos foram desenvolvidos, que reconhecem seqüências dentro do evento de elite. Mais particularmente, foi desenvolvido um iniciador que reconhece uma seqüência dentro da região flanqueadora 5' de A2704-12. Um segundo iniciador foi depois selecionado dentro da seqüência de DNA estranho, de modo que os iniciadores cobrem uma seqüência de cerca de 183 nucleotídeos. Constatou-se que os seguintes iniciadores dão resultados particularmente claros e reprodutíveis em uma reação de PCR em DNA de A2704-12:

DPA021: 5'-ggC.gTT.CgT.AgT.gAC.TgA.gg-3' (SEQ ID NO: 4)
(alvo: DNA da planta)

DPA024: 5'-gTT.TTA.CAA.CgT.gAC.Tgg-3' (SEQ ID NO: 8)
(alvo: DNA inserido)

Iniciadores voltados para uma seqüência endógena estão de preferência incluídos no coquetel de PCR. Esses iniciadores sevem como um controle interno em amostras desconhecidas e no controle positivo de DNA. Um resultado positivo com o par de iniciadores endógenos demonstra que há amplo DNA de qualidade adequada na preparação de DNA genômico para um produto de PCR a ser gerado. Os iniciadores endógenos foram selecionados para reconhecer um gene de seqüência conservada em *Glycine max*.

SOY01: 5'-gTC.AgC.CAC.ACA.gTg.CCT.AT-3' (SEQ ID NO: 20) (localizado no gene actin 1 de *Glycine max* (Inscrição J01298))

SOY02: 5'-gTT.ACC.gTA.CAg.gTC.TTT.CC-3' (SEQ ID NO: 21) (locali-

zado no gene actin 1 de *Glycine max* (Inscrição J01298))

2.2. Fragmentos amplificados

Os fragmentos amplificados esperados na reação de PCR são:

Para o par de iniciadores SOY01-SOY02: 413 bp (controle endógeno)

- 5 Para o par de iniciadores DPA0211-DPA024: 185 bp (evento de elite A2704-12)

2.3. DNA de gabarito

- 10 DNA de gabarito foi preparado de um ponche de folhas de acordo com Edwards et al. (Nucleic Acid Research, 19, p1349, 1991). Ao usar DNA preparado com outros métodos, deve ser feito um teste utilizando quantidades diferentes de gabarito. Normalmente, 50 ng de DNA de gabarito dão os melhores resultados.

2.4. Controles positivos e negativos designados

- 15 Para evitar falsos positivos ou negativos, foi determinado que os seguintes controles positivos e negativos devem ser incluídos em uma execução de PCR:

- 20 - Controle de mistura principal (controle negativo de DNA). Esse é uma PCR, no qual nenhum DNA é adicionado à reação. Quando o resultado esperado - nenhum produto de PCR - é observado, isso indica que o coquetel de PCR não foi contaminado com DNA de alvo.

- Controle de DNA positivo (amostra de DNA genômico, que sabidamente contém as seqüências transgênicas). A amplificação bem sucedida desse controle positivo demonstra que o PCR foi executado sob condições que permitem a amplificação de seqüências de alvo.

- 25 - Controle de DNA do tipo nativo. Esse é uma PCR, no qual o DNA de gabarito é DNA genômico preparado de uma planta não transgênica. Quando o resultado esperado - nenhuma amplificação de um produto de PCR transgênico, mas amplificação do produto de PCR endógeno - é observado, isso indica que não há amplificação de fundo transgênico, detectável, em uma amostra de DNA genômico.
- 30

2.5. Condições de PCR

Resultados ótimos foram obtidos sob as seguintes condições:

- a mistura de PCR para reações de 25 µl contém:

2,5 µl gabarito DNA

2,5 µl 10x Tensão de amplificação (fornecido com polimerase

Taq)

5

0,5 µl 10 mM dNTP's

0,5 µl DPA021 (10 pmols/µl)

0,5 µl DPA024 (10 pmols/µl)

0,25 µl SOY01 (10 pmols/µl)

0,25 µl SOY02 (10 pmols/µl)

10

0,1 µl Taq DNA polymerase (5 units/µl)

água até 25 µl

- o perfil de termociclização a ser seguido para resultados ótimos é o seguinte:

		4 min a 95°C
15	Seguido de:	1 min a 95°C
		1 min a 57°C
		2 min a 72°C
		por 5 ciclos
	Seguido de:	30 s a 92°C
20		30 s a 57°C
		1 min a 72°C
		por 25 ciclos
	Seguido de:	5 minutos a 72°C

2.6. Análise por gel de agarose

25

Para visualizar de modo ótimo os resultados do PCR, foi determinado que entre 10 e 20 µl das amostras de PCR devem ser aplicados sobre um gel de agarose de 1,5% (tampão de tris-borato), com um marcador de peso molecular apropriado (por exemplo, escala de 100 bp PHARMACIA).

30

2.7. Validação dos resultados

Foi determinado que dados de amostras de DNA de plantas transgênicas dentro de uma única execução de PCR e um único coquetel de

5 PCR não devem ser aceitáveis, a não ser que 1) o controle positivo de DNA mostre que os produtos de PCR esperados (fragmentos transgênicos e endógenos), 2) o controle negativo de DNA seja negativo para amplificação de PCR (sem fragmentos) e 3) o controle de DNA nativo mostre os resultados esperados (amplificação de fragmento endógeno).

10 Seguindo o Protocolo de Identificação de PCR para A2704-12, tal como descrito acima, colunas que mostram quantidades visíveis dos produtos de PCR transgênicos e endógenos dos tamanhos esperados, indicam que a planta correspondente, da qual o DNA de gabarito foi preparado, herdou o evento de elite A2704-12. As colunas que não mostram quantidades visíveis de nenhum dos produtos de PCR transgênicos e que mostram quantidades visíveis do produto de PCR endógeno, indicam que a planta correspondente da qual o DNA de gabarito genômico foi preparado, não compreende o evento de elite. As colunas que não mostram quantidades visíveis dos produtos endógenos e transgênicos, indicam que a qualidade e/ou quantidade do DNA genômico não permitiu que fosse gerado um produto de PCR. Essas plantas não puderam ser avaliadas. A preparação de DNA genômico deve ser repetida e uma nova execução de PCR, com os controles apropriados, tem de ser realizada.

20 2.8. Uso do protocolo de PCR de diferenciação para identificar A2704-12

25 Antes de tentar analisar incógnitas, uma execução de teste, com todos os controles apropriados, tem de ser realizada. O protocolo desenvolvido pode exigir otimização para componentes que podem diferir entre laboratórios (preparação de DNA de gabarito, polimerase de DNA de Taq, qualidade dos iniciadores, dNTP's, termociclizador etc.).

30 A amplificação da sequência endógena desempenha um papel essencial no protocolo. É preciso atingir condições de PCR e termociclagem que amplifiquem quantidades equimolares tanto da sequência endógena como da transgênica em um gabarito de DNA genômico, transgênico, conhecido. Sempre que o fragmento endógeno não for amplificado ou sempre que as sequências não forem amplificadas com as mesmas intensidades de marcação com brometo de etídio, tal como avaliado por eletroforese de gel

de agarose, pode ser necessária a otimização das condições de PCR.

Material de folhas de *Glycine max* de diversas plantas, algumas das quais compreendem A2704-12, foi testado de acordo com o protocolo descrito acima. Amostras do evento de elite A2704-12 e de *Glycine max* do tipo nativo foram tomadas, em cada caso, como controles positivo e negativo.

A figura 2 ilustra o resultado obtido com o protocolo de identificação de PCR para A2704-12 em diversas amostras de plantas de soja (colunas 1 a 14). Verificou-se que as amostras na coluna 1 continham o evento de elite, quando a banda de 185 bp é detectada, enquanto as amostras nas colunas 2, 3 e 4 não compreendem A2704-12. A coluna 2 compreende outro evento de elite de soja, a coluna 3 representa um controle de *Glycine max* não transgênica; a coluna 4 representa a amostra de controle negativo (água), e a coluna 5 representa O Marcador de Peso Molecular (100 bp).

3. Uso de um fragmento de integração específico como sonda para detecção de material que compreende A2704-12

Um fragmento de integração específico de A2704-12 é obtido por amplificação de PCR usando os iniciadores específicos DPA021 (SEQ ID NO: 4) e DPA024 (SEQ ID NO: 8) ou por síntese química é marcado. Esse fragmento de integração é usado como uma sonda específica para a detecção de A2704-12 em amostras biológicas. Ácido nucléico é extraído das amostras de acordo com procedimentos usuais. Esse ácido nucléico é depois posto em contato com a sonda específica, sob condições de hibridização, que estão otimizadas, para permitir a formação de um híbrido. A formação do híbrido é depois detectada para indicar a presença de ácido nucléico de A2704-12 na amostra. Opcionalmente, o ácido nucléico nas amostras é amplificado usando os iniciadores específicos, antes do contato com a sonda específica. Alternativamente, o ácido nucléico é marcado antes do contato com a sonda específica, em vez do fragmento de integração. Opcionalmente, a sonda específica está ligada em um veículo sólido (tal como, mas não limitado a, um filtro, tira ou glóbulos), antes do contato com as amostras.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para identificar o evento elite A2704-12 em amostras biológicas, caracterizado pelo fato de que compreende a detecção de uma região específica de A2704-12 compreendendo parte da região flangeadora 5' ou 3' do referido evento elite e parte do DNA exógeno contíguo à mesma por meio de:

a) amplificação de um fragmento de DNA de entre 100 e 500 pb de um ácido nucléico presente nas referidas amostras biológicas, usando uma reação em cadeia da polimerase com pelo menos dois iniciadores, sendo que um dos referidos iniciadores reconhece a região flangeadora 5' de A2704-12 e o outro iniciador dos referidos iniciadores reconhece uma sequência dentro do DNA exógeno contíguo à região flangeadora 5', ou sendo que um dos referidos iniciadores reconhece a região flangeadora 3' de A2704-12 e o outro iniciador dos referidos iniciadores reconhece uma sequência dentro do DNA exógeno contíguo à região flangeadora 3', ou

b) hibridação de um ácido nucleico presente nas referidas amostras biológicas com uma sonda específica para o evento elite A2704-12 que pode hibridizar com uma sequência que compreende parte da região flangeadora 5' ou 3' de A2704-12 e parte da sequência do DNA exógeno contíguo à mesma sob condições padrão de rigor,

em que a referida região flangeadora 5' compreende a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:1 do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 209, e o referido DNA exógeno contíguo à referida região flangeadora 5' compreende a sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO:1 do nucleotídeo 210 ao nucleotídeo 720, a referida região flangeadora 3' compreende a sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO:2 do nucleotídeo 569 ao nucleotídeo 1000, e o referido DNA exógeno contíguo à referida região flangeadora 3' compreende a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2 do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 568, e em que condições padrão de rigor compreendem as seguintes etapas: 1) imobilizar fragmentos de DNA genômico de planta sobre um filtro, 2) pré-hibridizar o filtro por 1 a 2 horas, a 42°C, em 50% de

formamida, 5 X SSPE, 2 X reagente de Denhardt e 0,1% de SDS, ou por 1 a 2 horas, a 68°C, em 6 X SSC, 2 X reagente de Denhardt e 0,1% de SDS, 3) adicionar a sonda de hibridização que foi marcada, 4) incubar por 16 a 24 horas, 5) lavar o filtro por 20 min, à temperatura ambiente, em 1 X SSC, 0,1% de SDS, 6) lavar o filtro três vezes por 20 min a cada vez, a 68°C, em 0,2 X SSC, 0,1% de SDS, e 7) expor o filtro por 24 a 48 horas a um filme de raios X, a -70°C, com uma tela intensificadora, e

em que o referido evento A2704-12 é definido como compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 160 ao nucleotídeo 260 e a sequência de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 520 ao nucleotídeo 620.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido iniciador que reconhece a região flanqueadora 5' consiste em uma sequência de nucleotídeo de 17 a 200 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 209, ou o referido iniciador, que reconhece a região flanqueadora 3' de A2704-12 consiste em uma sequência de nucleotídeo de 17 a 200 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 569 ao nucleotídeo 1000, e o referido iniciador, que reconhece uma sequência dentro do DNA exógeno, consiste em 17 a 200 nucleotídeos consecutivos selecionados da sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 210 ao nucleotídeo 720, ou da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 568.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido iniciador, que reconhece a região flanqueadora 5' compreende em sua extremidade extrema de 3' uma sequência de nucleotídeo de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 209, ou o referido iniciador, que reconhece a região flanqueadora 3' de A2704-12, compreende em sua extremidade extrema de 3' uma sequência

de nucleotídeo de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 569 ao nucleotídeo 1000, e o referido iniciador, que reconhece uma sequência dentro do DNA exógeno, compreende em sua
5 extremidade 3' pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo do complemento completo da SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 210 ao nucleotídeo 720, ou da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 568.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo
10 fato de que os referidos iniciadores compreendem a sequência de SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 8, respectivamente.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que os referidos iniciadores amplificam um fragmento de cerca de 185 pb.

15 6. Kit para identificar o evento elite A2704-12 em amostras biológicas, caracterizado pelo fato de que compreende um iniciador que reconhece a região flanqueadora 5' de A2704-12, sendo que a referida região flanqueadora tem a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 209, ou um iniciador que reconhece a região
20 flanqueadora 3' de A2704-12, sendo que a referida região flanqueadora 3' tem a sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 569 ao nucleotídeo 1000, e um iniciador que reconhece uma sequência dentro do DNA exógeno, sendo que o referido DNA exógeno tem a sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO:
25 1, do nucleotídeo 210 ao nucleotídeo 720 ou a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 22, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 568, em que o referido evento A2704-12 é definido como compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 160 ao nucleotídeo 260 e a sequência de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 520 ao nucleotídeo 620.

30 7. Kit de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o referido iniciador, que reconhece a região flanqueadora 5', consiste em uma sequência de nucleotídeo de 17 a 200 nucleotídeos consecutivos,

selecionados da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 209, ou o referido iniciador, que reconhece a região flangeadora 3' de A2704-12, consiste em uma sequência de nucleotídeo de 17 a 200 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 569 ao nucleotídeo 1000, e o referido iniciador, que reconhece uma sequência dentro do DNA exógeno, consiste em 17 a 200 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 210 ao nucleotídeo 720, ou da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 568.

8. Kit de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o referido iniciador que reconhece a região flangeadora 5', compreende em sua extremidade extrema 3' uma sequência de nucleotídeo de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 209, ou o referido iniciador, que reconhece a região flangeadora 3' de A2704-12, compreende em sua extremidade extrema 3' uma sequência de nucleotídeo de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 569 ao nucleotídeo 1000, e o referido iniciador, que reconhece uma sequência dentro do DNA exógeno, compreende em sua extremidade 3' pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 210 ao nucleotídeo 720, ou da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 568.

9. Kit de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que compreende um iniciador, que consiste na sequência de SEQ ID NO: 4 e um iniciador, que consiste na sequência de SEQ ID NO: 8.

10. Par de iniciadores para uso em um protocolo de PCR para identificação de um evento A2704-12, caracterizado pelo fato de que compreende

a) um primeiro iniciador com uma sequência que, sob condições

de PCR otimizadas, reconhece especificamente uma sequência dentro da região flanqueadora 5' de A2704-12, e um segundo iniciador que, sob condições de PCR otimizadas, reconhece especificamente uma sequência dentro do DNA exógeno contígua à referida região flanqueadora 5' de A2704-12, ou

b) um primeiro iniciador com uma sequência que, sob condições de PCR otimizadas, reconhece especificamente uma sequência dentro da região flanqueadora 3' de A2704-12, e um segundo iniciador que, sob condições de PCR otimizadas, reconhece especificamente uma sequência dentro do DNA exógeno contígua à referida região flanqueadora 3' de A2704-12,

em que a referida região flanqueadora 5' tem a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 209, a referida região flanqueadora 3' tem a sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 569 ao nucleotídeo 1000,

o referido DNA exógeno contíguo à referida região flanqueadora 5' compreende a sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO:1 do nucleotídeo 210 ao nucleotídeo 720, e o referido DNA exógeno contíguo à referida região flanqueadora 3' compreende a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2 do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 568,

em que o referido evento A2704-12 é definido como compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 160 ao nucleotídeo 260 e a sequência de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 520 ao nucleotídeo 620.

11. Par de iniciadores de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o referido primeiro iniciador consiste em uma sequência de nucleotídeo de 17 a 200 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 209 ou uma sequência de nucleotídeo de 17 a 200 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 569 ao nucleotídeo

1000, e o referido segundo iniciador consiste em uma sequência de nucleotídeo de 17 a 200 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 210 ao nucleotídeo 720 ou uma sequência de nucleotídeo de 17 a 200 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 568.

12. Par de iniciadores de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o referido primeiro iniciador compreende em sua extremidade extrema 3' uma sequência de nucleotídeo de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 209 ou uma sequência de nucleotídeo de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 569 ao nucleotídeo 1000, e o referido segundo iniciador compreende em sua extremidade extrema 3' uma sequência de nucleotídeo de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo do complemento completo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 210 ao nucleotídeo 720 ou uma sequência de nucleotídeo de pelo menos 17 nucleotídeos consecutivos, selecionados da sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 568.

13. Par de iniciadores, caracterizado pelo fato de que compreende um primeiro iniciador que reconhece especificamente uma sequência dentro do DNA exógeno contíguo à sequência flanqueadora 5' de A2704-12, e um segundo iniciador compreendendo em sua extremidade extrema 3' a sequência de SEQ ID NO: 4, o referido DNA exógeno contíguo à sequência flanqueadora 5' de A2704-12 tendo a sequência de nucleotídeos do complemento completo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 210 ao nucleotídeo 720, em que o referido evento A2704-12 é definido como compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 160 ao nucleotídeo 260 e a sequência de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 520 ao nucleotídeo 620.

14. Par de iniciadores, caracterizado pelo fato de que

compreende um primeiro iniciador compreendendo em sua extremidade extrema 3' a sequência de SEQ ID NO: 8, e um segundo iniciador reconhecendo especificamente uma sequência dentro da sequência flanqueadora 5' de A2704-12, a referida sequência flanqueadora 5' de A2704-12 possuindo a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 209, em que o referido evento A2704-12 é definido como compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 160 ao nucleotídeo 260 e a sequência de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 520 ao nucleotídeo 620.

10 15. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a referida sonda específica compreende a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 160 a 260 ou SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 520 a 620, ou o complemento completo das referidas sequências.

15 16. Kit para identificar o evento elite A2704-12 em amostras biológicas, caracterizado pelo fato de compreender uma sonda específica para o evento elite A2704-12, em que a referida sonda é capaz de hibridizar-se sob condições padrão de rigor de hibridização a uma sequência compreendendo parte da região flanqueadora 5' ou 3' de A2704-12 e parte da sequência do DNA exógeno contíguo à mesma, ou o complemento completo das mesmas, em que a referida região flanqueadora 5' compreende a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:1 do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 209, e o referido DNA exógeno contíguo à referida região flanqueadora 5' compreende a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:1 do nucleotídeo 210 ao nucleotídeo 720, a referida região flanqueadora 3' compreende a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2 do nucleotídeo 569 ao nucleotídeo 1000, e o referido DNA exógeno contíguo à referida região flanqueadora 3' compreende a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2 do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 568, e em que condições padrão de rigor de hibridização compreendem as seguintes etapas: 1) imobilizar fragmentos de DNA genômico de planta sobre um filtro, 2) pré-hibridizar o filtro por 1 a 2 horas, a 42°C, em 50% de formamida, 5 X SSPE, 2 X

reagente de Denhardt e 0,1% de SDS, ou por 1 a 2 horas, a 68°C, em 6 X SSC, 2 X reagente de Denhardt e 0,1% de SDS, 3) adicionar a sonda de hibridização que foi marcada, 4) incubar por 16 a 24 horas, 5) lavar o filtro por 20 min, à temperatura ambiente, em 1 X SSC, 0,1% de SDS, 6) lavar o
 5 filtro três vezes por 20 min a cada vez, a 68°C, em 0,2 X SSC, 0,1% de SDS, e 7) expor o filtro por 24 a 48 horas a um filme de raios X, a -70°C, com uma tela intensificadora, e

em que o referido evento A2704-12 é definido como compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 160 ao
 10 nucleotídeo 260 e a sequência de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 520 ao nucleotídeo 620.

17. Kit de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a referida sonda específica compreende a sequência de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 160 a 260 ou SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 560 a 620, ou
 15 o complemento completo das referidas sequências.

18. Sonda específica para a identificação do evento elite A2704-12 em amostras biológicas, caracterizada pelo fato de que é capaz de hibridizar-se sob condições padrão de rigor de hibridização a uma sequência compreendendo parte da região flanqueadora 5' ou 3' de A2704-12 e parte
 20 da sequência do DNA exógeno contíguo à mesma, ou o complemento completo das mesmas, em que a referida região flanqueadora 5' compreende a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:1 do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 209, e o referido DNA exógeno contíguo à referida região flanqueadora 5' compreende a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:1
 25 do nucleotídeo 210 ao nucleotídeo 720, a referida região flanqueadora 3' compreende a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2 do nucleotídeo 569 ao nucleotídeo 1000, e o referido DNA exógeno contíguo à referida região flanqueadora 3' compreende a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO:2 do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 568, e em que condições padrão de
 30 rigor de hibridização compreendem as seguintes etapas: 1) imobilizar fragmentos de DNA genômico de planta sobre um filtro, 2) pré-hibridizar o filtro por 1 a 2 horas, a 42°C, em 50% de formamida, 5 X SSPE, 2 X

reagente de Denhardt e 0,1% de SDS, ou por 1 a 2 horas, a 68°C, em 6 X SSC, 2 X reagente de Denhardt e 0,1% de SDS, 3) adicionar a sonda de hibridização que foi marcada, 4) incubar por 16 a 24 horas, 5) lavar o filtro por 20 min, à temperatura ambiente, em 1 X SSC, 0,1% de SDS, 6) lavar o
 5 filtro três vezes por 20 min a cada vez, a 68°C, em 0,2 X SSC, 0,1% de SDS, e 7) expor o filtro por 24 a 48 horas a um filme de raios X, a -70°C, com uma tela intensificadora, e

em que o referido evento A2704-12 é definido como compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 160 ao
 10 nucleotídeo 260 e a sequência de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 520 ao nucleotídeo 620.

19. Sonda de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de compreender a sequência de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 160 a 260 ou SEQ ID NO: 2, do nucleotídeo 520 a 620, ou o complemento
 15 completo das referidas sequências, e

em que o referido evento A2704-12 é definido como compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 160 ao nucleotídeo 260 e a sequência de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 520 ao nucleotídeo 620.

20. Ácido nucleico específico para a identificação do evento elite A2704-12 em amostras biológicas, caracterizado pelo fato de que consiste em uma região específica 5' do evento A2704-12 ou uma região específica 3' do evento A2307-12, em que a referida região específica 5' contém uma parte do DNA da planta do evento A2704-12 e uma parte do DNA exógeno
 25 inserido do evento A2704-12 a jusante e contígua com a referida parte do DNA da planta, em que a referida região específica 3' contém uma parte do DNA exógeno inserido do evento A2704-12 e uma parte do DNA da planta do evento A2704-12 a jusante e contígua com a referida parte do DNA inserido, em que o DNA da planta na referida região específica 5' têm a
 30 sequência de SEQ ID NO: 1, do nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 209, em que o DNA exógeno inserido na referida região específica 5' tem a sequência de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 210 ao nucleotídeo 720, em que o DNA

exógeno na referida região específica 3' tem a sequência de SEQ ID NO: 2, de nucleotídeo 1 ao nucleotídeo 568, e em que o DNA da planta na referida região específica 3' tem a sequência de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 569 ao nucleotídeo 1000, ou o complemento completo das referidas sequências, e em que a referida região específica 5' compreende a sequência de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 160 ao nucleotídeo 260 e a referida região específica 3' compreende a sequência de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 520 ao nucleotídeo 620 ou o complemento completo das referidas sequências, e em que o referido evento A2704-12 é definido como compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 1 do nucleotídeo 160 ao nucleotídeo 260 e a sequência de SEQ ID NO: 2 do nucleotídeo 520 ao nucleotídeo 620.

21. Método para confirmar a pureza de sementes, caracterizado pelo fato de que compreende a detecção de uma região específica de A2704-12 compreendendo parte da região flanqueadora 5' ou 3' de A2704-12 e parte da sequência do DNA exógeno contíguo à mesma com um par de iniciadores específicos ou sonda específica que reconhece especificamente a região flanqueadora 5' ou 3' de A2704-12 e o DNA exógeno contíguo à mesma, em amostras de sementes, em que o referido par de iniciadores é o par de iniciadores como definido em qualquer uma das reivindicações 10 a 14, e em que a referida sonda específica é a sonda como definida na reivindicação 18 ou 19.

22. Método para analisar sementes em relação à presença de A2704-12, caracterizado pelo fato de que compreende a detecção de uma região específica de A2704-12 compreendendo parte da região flanqueadora 5' ou 3' de A2704-12 e parte da sequência do DNA exógeno contíguo à mesma com um iniciador específico ou uma sonda específica, que reconhece especificamente a região flanqueadora 5' ou 3' de A2704-12 e o DNA exógeno contíguo à mesma, em amostras de lotes de sementes, em que o referido par de iniciadores é o par de iniciadores como definido em qualquer uma das reivindicações 10 a 14, e em que a referida sonda específica é a sonda como definida na reivindicação 18 ou 19.

Fig. 1

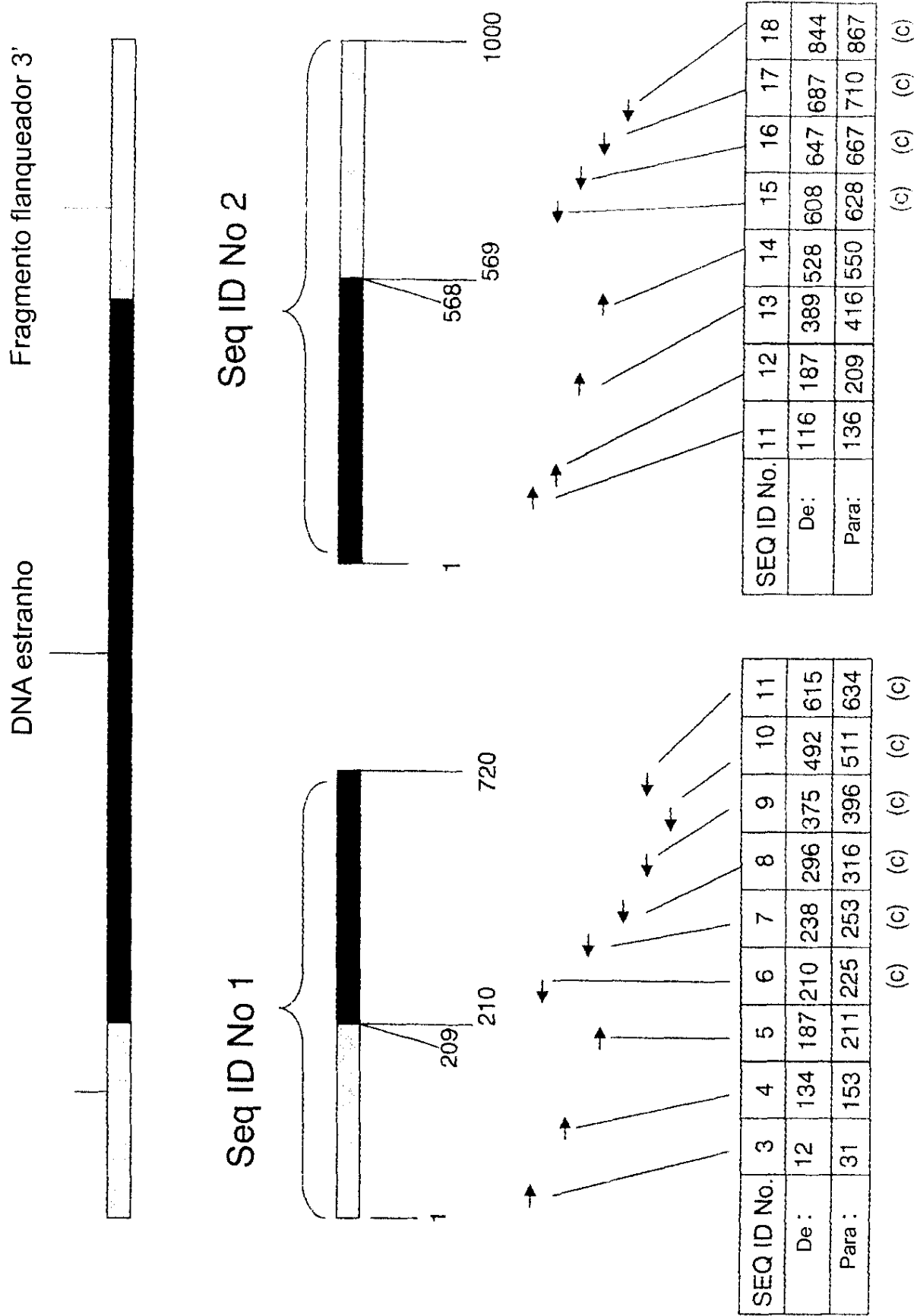


Fig. 2

