



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

(11) PI 0716347-9 B1

(22) Data do Depósito: 30/10/2007

(45) Data de Concessão: 06/06/2017



(54) Título: POLINULEOTÍDEO ISOLADO, MÉTODOS PARA IDENTIFICAR SE UMA AMOSTRA BIOLÓGICA COMPREENDE UM POLINUCLEOTÍDEO, PARA DETECTAR A PRESENÇA DE UM POLINUCLEOTÍDEO, PARA DETECTAR A PRESENÇA DE UMA SEQUÊNCIA, PARA SELECIONAR SEMENTES E PARA PRODUIR UM VEGETAL TOLERANTE AO INIBIDOR DE ALS, PARES DE PRIMERS DE DNA E CONSTRUÇÃO DE UM DNA DE EXPRESSÃO

(51) Int.Cl.: C12N 15/82; A01H 5/00; A01H 1/04

(30) Prioridade Unionista: 08/06/2007 US 60/942,676, 31/10/2006 US 60/863,721

(73) Titular(es): E. I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY

(72) Inventor(es): ANTHONY J. KINNEY; KEVIN L. STECCA; KNUT MEYER

"POLINULEOTÍDEO ISOLADO, MÉTODOS PARA IDENTIFICAR SE UMA AMOSTRA BIOLÓGICA COMPREENDE UM POLINUCLEOTÍDEO, PARA DETECTAR A PRESENÇA DE UM POLINUCLEOTÍDEO, PARA DETECTAR A PRESENÇA DE UMA SEQUÊNCIA, PARA SELECIONAR SEMENTES E PARA PRODUIR UM VEGETAL TOLERANTE AO INIBIDOR DE ALS, PARES DE *PRIMERS* DE DNA E CONSTRUÇÃO DE UM DNA DE EXPRESSÃO"

[001] Este pedido de patente reivindica o benefício do pedido de Patente US 60/863721, depositado em 31 de outubro de 2006, e do Pedido de Patente US 60/942676, depositado em 8 de junho de 2007, cujo todo o conteúdo dos quais estão incorporados ao presente pela referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção esta relacionada com o campo da biologia molecular. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a plantas que exibem um fenótipo de elevada concentração de ácido oleico, além de um fenótipo de tolerância a herbicidas, conferido pela supressão de um gene FAD2 juntamente com a expressão de uma sequência que confere tolerância aos inibidores de ALS.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] A expressão de genes estranhos em vegetais é conhecida por ser influenciada pela sua localização no genoma da planta, talvez devido à estrutura cromática (por exemplo, heterocromatina) ou a pela proximidade dos elementos reguladores da transcrição (por exemplo, potenciadores) próximo ao local de integração (Weising *et al.* (1988) *Ann. Rev. Genet* 22: 421-477). Ao mesmo tempo, a presença do transgene em diferentes locais no genoma influencia o fenótipo da planta de diferentes formas. Por este motivo, muitas vezes é necessário selecionar um grande número de eventos, a fim de identificar um evento caracterizado pela expressão de um gene de interesse

introduzido. Por exemplo, foi observado em plantas e outros organismos que pode haver uma grande variação nos níveis de expressão de um gene introduzido entre os eventos. Também pode haver diferenças espaciais ou temporais nos padrões de expressão, por exemplo, diferenças com relação à expressão de um transgene em diferentes tecidos vegetais, que podem não corresponder aos padrões esperados a partir de elementos presentes na construção do gene introduzido. É também observado que a inserção do transgene pode afetar a expressão gênica endógena. Por estas razões, é comum para produzir centenas de milhares de diferentes eventos e selecionar os eventos para um único evento que tenha os níveis de expressão e padrões do transgene desejados para fins comerciais. Um evento que tem níveis ou padrões de expressão transgene desejados é útil para a introgressão genéticas do transgene de outras origens por reprodução sexuada usando métodos convencionais. Descendentes desses cruzamentos mantêm as características de expressão do transgene do transformante original. Esta estratégia é usada para garantir uma expressão gênica em um número variável que estão bem adaptados às condições locais de crescimento.

[004] Seria vantajoso ter a capacidade de detectar a presença de um evento específico, a fim de se determinar a se a progênie proveniente do cruzamento sexuada possui o transgene de interesse. Além disso, um método para a detecção de um determinado evento seria útil para cumprir regulamentações que necessitam da aprovação de pré-mercado e rotulagem de alimentos derivados de plantas recombinantes cultivadas, ou para uso no monitoramento ambiental, monitoramento de traços nas culturas no campo ou o acompanhamento de produtos derivados de uma colheita, bem como, para uso em assegurar a conformidade das partes sujeitas a regulação ou cláusulas contratuais.

[005] Na produção comercial de cultivos, é desejável que plantas indesejáveis (isto é, “ervas daninhas”) sejam eliminadas de maneira fácil e

rápida de um campo de cultivo de plantas. O tratamento ideal seria aquele em que poderia ser aplicado a um campo inteiro, mas que eliminaria apenas as plantas indesejáveis, mantendo as plantas cultivadas integras. Tal sistema de tratamento implicaria na utilização de espécies vegetais de cultivo que são tolerantes a um herbicida de modo que, quando o herbicida fosse pulverizado em um campo de cultivo de plantas tolerantes a herbicidas, as espécies vegetais continuariam a prosperar enquanto as ervas daninhas não tolerantes ao herbicida seriam mortas ou severamente danificadas.

[006] Lipídios vegetais encontram sua principal utilização como óleos comestíveis, sob a forma de triacilgliceróis. O desempenho específico e os atributos saudáveis dos óleos comestíveis são amplamente determinados pela sua composição de ácidos graxos. A maioria dos óleos vegetais provenientes de variedades comerciais de plantas é composta basicamente de ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1), ácido linoleico (18:2) e ácido linolênico (18:3). Os ácidos palmítico e esteárico são ácidos graxos saturados de, respectivamente, 16- e 18-carbonos de comprimento. Os ácidos oleico, linoleico e linolênico são ácidos graxos insaturados de 18-carbonos de comprimento, contendo, respectivamente, uma, duas e três duplas ligações. O ácido oleico é referido como um ácido graxo mono-insaturados, enquanto os ácidos linoleico e linolênico são referidos como ácidos graxos poli-insaturados.

[007] Um óleo vegetal com baixo teor de ácidos graxos saturados e alto teor de ácidos graxos mono-insaturados proporcionaria benefícios significativos para a saúde dos consumidores, bem como os benefícios econômicos para os produtores de óleo. Como um exemplo, óleo de canola é considerado um óleo muito saudável. Entretanto, no uso, o alto nível de ácidos graxos poli-insaturados no óleo de canola torna o óleo instável, oxidado facilmente, e suscetível ao desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis (Gailliard, 1980, vol. 4, pp. 85-116 em: Stumpf, PK, ED., *The*

Biochemistry of Plants, Academic Press, Nova Iorque). Os níveis de ácidos graxos polinsaturados podem ser reduzidos por hidrogenação, mas os custos deste processo e consequente produção nutricionalmente questionável de isômeros trans dos ácidos graxos insaturados remanescentes reduz a vantagem geral de o óleo hidrogenado (Mensink *et al.* *New England J. Medicine* (1990) N323: 439-445) 439-445). Problemas semelhantes ocorrem com óleos de soja e milho.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[008] São fornecidas composições e métodos relacionados à soja transgênica com alto teor de ácido oleico / tolerante a inibidores de ALS. Especificamente, a presente invenção fornece plantas de soja contendo um evento DP-305423-1 que transmite um fenótipo de alto teor de ácido oleico e tolerância a pelo menos um herbicida inibidor de ALS. As plantas de soja abrigando o evento PD-305423-1 na localização cromossômica recitada compreendem as junções genômicas/transgene tendo, pelo menos, a sequência de polinucleotídeos das SEQ ID NOs: 8, 9, 14, 15, 20, 21, 83 ou 84. A caracterização do sítio de inserção no genoma do evento DP-305423-1 fornece uma eficiência de reprodução melhorada e permite a utilização de marcadores moleculares para rastrear o transgene inserido nas populações reprodutoras e descendentes destas. São fornecidos vários métodos e composições para a identificação, detecção e a utilização da soja evento PD-305423-1.

[009] Em um exemplo de realização, a presente invenção inclui um polinucleotídeo isolado compreendendo as SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88.

[0010] Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui uma planta de soja ou uma semente de soja compreendendo as SEQ ID

NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88.

[0011] Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui um método para a identificar uma amostra biológica compreendendo: a) contactar a mencionada amostra biológica com um primeiro e um segundo *primer*; b) amplificar um polinucleotídeo compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88; e c) confirmando se a amostra biológica mencionada contém os polinucleotídeos compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88. O método pode ainda incluir a detecção de um polinucleotídeo compreendendo as SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88 por hibridização de uma sonda, onde a sonda mencionada hibridiza sob condições de alta estrigência de hibridização com um polinucleotídeo compreendendo as SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88. O primeiro ou segundo *primer* pode incluir um fragmento de uma região genômica 5', uma região genômica 3' ou uma região de inserção SEQ ID NOs: 5, 6, 7 ou 82. O primeiro ou segundo *primer* pode incluir, pelo menos, 8 nucleotídeos consecutivos de uma região genômica 5', uma região genômica 3' ou uma região de inserção SEQ ID NOs: 5, 6, 7 ou 82. Um dos *primers* (primeiro ou segundo) pode compreender um fragmento da região genômica 5' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82 e o outro (primeiro ou segundo) *primer* restante pode incluir um fragmento da região genômica 3' SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82. O primeiro ou segundo *primer* pode compreender as SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57,

58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 93 ou 94.

[0012] Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui um método de detecção da presença de um polinucleotídeo compreendendo as SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88 em uma amostra biológica contendo DNA, compreendendo: (a) extrair uma amostra do DNA da amostra biológica mencionada; (b) contactar a mencionada amostra de DNA com pelo menos um par de moléculas de *primers* de DNA seleccionados a partir do grupo constituído por: i) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 26 e SEQ ID NO: 27; ii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 29 e SEQ ID NO: 30; iii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 31 e SEQ ID NO: 32; iv) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 33 e 34; v) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 35 e SEQ ID NO: 36; vi) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 37 e SEQ ID NO: 38; vii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 39 e SEQ ID NO: 40; viii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 41 e SEQ ID NO: 42; ix) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 43 e SEQ ID NO: 44; x) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 45 e SEQ ID NO: 46; xi) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 48; xii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 49; xiii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 50 e SEQ ID NO: 51; xiv) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 52 e SEQ ID NO: 53; xv) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 54 e SEQ ID NO: 49; xvi) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 55 e SEQ ID NO: 46; xvii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 33 e SEQ ID NO: 56; xviii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 57 e SEQ ID NO: 58; xix) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 59 e SEQ ID NO: 60; xx) sequências

compreendendo as SEQ ID NO: 61 e SEQ ID NO: 36; xxi) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 35 e SEQ ID NO: 62; xxii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 37 e SEQ ID NO: 63; xxiii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 64 e SEQ ID NO: 65; xxiv) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67; xxv) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 68 e SEQ ID NO: 69; xxvi) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 70 e SEQ ID NO: 71; xxvii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 72 e SEQ ID NO: 73; xxviii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 74 e SEQ ID NO: 75; xxix) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 76 e SEQ ID NO: 77; xxx) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 78 e SEQ ID NO: 79; xxxi) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 80 e SEQ ID NO: 81;e xxxii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 89 e SEQ ID NO: 90; (c) fornecer condições para a reação de amplificação do DNA; (d) realizar a reação de amplificação do DNA mencionada, produzindo assim uma molécula de DNA amplificada, e (e) detectar a molécula de DNA amplificada, em que a detecção da molécula de DNA amplificada mencionada indica a presença de um polinucleotídeo compreendendo as SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88.

[0013] Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui um método para detectar a presença de SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88 em uma amostra biológica, o método compreendendo (a) contatar as amostras biológicas contendo o DNA sob condições estritas de hibridização com uma sonda polinucleotídica de hibridização, em que a sonda mencionada se hibridiza sob condições estritas de hibridização com uma polinucleotídeo que compreende as SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, (b)

detectar a hibridização da sonda com o DNA. A amostra biológica pode incluir tecido de soja. Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui um *primer* de DNA isolado compreendendo pelo menos uma sequência selecionada a partir do grupo constituído pelas SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 93 ou 94 ou o complemento destas.

[0014] Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui um método para detectar a presença das SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88 em uma amostra biológica, compreendendo o método em: (a) contatar a amostra biológica contendo o DNA sob condições estridentes de hibridização com uma sonda polinucleotídica, em que a sonda mencionada hibridiza sob condições estridentes de hibridização com um polinucleotídeo compreendendo as SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, (b) detectar a hibridização da sonda ao DNA. A amostra biológica pode compreender um tecido de soja. Em um exemplo de realização, a presente invenção inclui um *primer* de DNA isolado compreendendo as SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 93 ou 94 ou o complemento destes.

[0015] Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui um par de *primers* de DNA compreendendo um primeiro e um segundo *primer* de DNA, em que os *primers* de DNA são de um comprimento suficiente de nucleotídeos contíguos das SEQ ID NOs: 5, 6, 7 ou 82, para funcionar como

primers de DNA diagnósticos compreendendo as SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88.

[0016] Em outro exemplo de realização, a presente invenção uma sonda de DNA, onde a sonda é de um comprimento suficiente de nucleotídeos contíguos das SEQ ID NOs: 5, 6, 7 ou 82, para funcionar como uma sonda de DNA diagnóstica compreendendo as SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88.

[0017] Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui um método para selecionar sementes por um polinucleotídeo compreendendo as SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, compreendendo em: (a) contatar a amostra biológica contendo o DNA da semente mencionada com o primeiro e segundo *primer* de DNA (b) amplificar o polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo das SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88; e c) detectar o polinucleotídeo amplificado mencionado.

[0018] Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui um método para selecionar sementes a partir de um polinucleotídeo compreendendo as SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, compreendendo em: (a) contatar a amostra biológica compreendendo o DNA da semente mencionada sob condições estridentes de hibridização com uma sonda polinucleotídica, que hibridiza sob condições estridentes de hibridização com um polinucleotídeo compreendendo as SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, (b) detectar a hibridização da sonda ao DNA.

[0019] Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui um método para produzir um vegetal com alto teor de ácido oleico e tolerante a inibidores de ALS compreendendo o método em reproduzir uma planta que compreende a SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, e selecionar as progênes pela análise de progênes que compreende os polinucleotídeos das SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88.

[0020] Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui uma sequência de DNA isolada compreendendo pelo menos uma sequência de nucleotídeo selecionado a partir do grupo constituído pelas SEQ ID NOs: (a) uma sequência nucleotídica estabelecida nas SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 93 ou 94, e (b) um complemento de comprimento total de uma sequência de nucleotídeos de (a).

[0021] Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui um par de sequências de *primers* de DNA isolados, contendo cada um, pelo menos, dez nucleotídeos e que, quando utilizados em conjunto em um procedimento de amplificação de DNA irão produzir um fragmento de DNA amplificado compreendendo um polinucleotídeo que compreende a SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88. As sequências do par de *primers* de DNA isolados podem compreender uma primeira sequência *primer* escolhido a partir do grupo constituído por: a) uma região genômica 5' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82; e b) um região genômica 3' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82; e uma segunda sequência de *primer* escolhida a partir de uma região de inserção de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82.

[0022] Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui um método para controlar ervas daninhas em uma área de cultivo compreendendo a aplicação de uma quantidade efetiva de um inibidor de ALS na área do cultivo de soja contendo plantas que compreende um polinucleotídeo compreendendo a SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88. Os inibidores da ALS pode ser um herbicida sulfonilureia ou um herbicida imidazolinona. Uma combinação de diferentes inibidores de ALS pode ser utilizada. Os inibidores da ALS ou a combinação de inibidores de ALS podem ser utilizados em combinação com um ou mais herbicidas não-inibidores de ALS.

[0023] Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui uma construção de expressão de DNA compreendendo um polinucleotídeo isolado da invenção operacionalmente ligado a pelo menos uma sequência reguladora.

[0024] Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui progênie de plantas transgênicas obtidas a partir de sementes transgênicas da presente invenção.

[0025] Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui uma construção de DNA recombinante compreendendo: um primeiro e segundo cassete de expressão, em que o primeiro cassete de expressão está operacionalmente ligado compreende: (a) um promotor da soja KTi3 ; (b) um fragmento *gm-fad2-1*, e (c) um terminador transcricional KTi3 da soja; e o segundo cassete de expressão mencionado operacionalmente ligado compreende,: (i) um promotor SAMS da soja, (ii) um líder SAMS 5' não traduzido e um *intron* e, (iii) uma molécula de DNA codificante de *gm-hra* da soja, e (iv) um terminador transcricional *als* da soja.

[0026] Em outro exemplo de realização, a presente invenção inclui uma planta ou semente compreendendo uma construção de expressão de DNA da reivindicação 27. A planta ou semente podem ser uma planta de soja ou uma semente de soja.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS E LISTAS DE SEQUÊNCIAS

[0027] A Figura 1 apresenta um mapa esquemático do fragmento PHP19340A indicando vários elementos genéticos e sítios de restrição enzimática para *Nco* I e *Hind* III.

[0028] A Figura 2 apresenta um mapa esquemático do fragmento PHP17752A indicando vários elementos genéticos e sítios de restrição enzimática para *Nco* I e *Hind* III.

[0029] A Figura 3 apresenta um mapa esquemático do fragmento PHP19340 indicando vários elementos genéticos e sítios de restrição enzimática para *Asc* I, *Nco* I e *Hind* III.

[0030] A Figura 4 apresenta um mapa esquemático do fragmento PHP17752 indicando vários elementos genéticos e sítios de restrição enzimática para *Asc* I, *Nco* I e *Hind* III.

[0031] A Figura 5 exibe um experimento de hibridização *Southern* do DNA genômico a partir de tecido foliar de soja de plantas individuais do DP-305423-1 (geração T5 e T4) e do controle inalterado (Jack), digerido com *Hind* III e sondado com a sonda para o gene *gm-fad2-1*.

[0032] A Figura 6 exibe um experimento de hibridização *Southern* do DNA genômico isolado a partir de tecido foliar de soja de plantas individuais do DP-305423-1 (geração T5 e T4) e do controle inalterado (Jack), digerido com *Nco* I e sondado com a sonda para o gene *gm-fad1A*.

[0033] A Figura 7 exibe um experimento de hibridização *Southern* do DNA genômico isolado a partir de tecido foliar de soja de plantas individuais

do DP-305423-1 (geração T5 e T4) e do controlo inalterado (Jack), digerido com *Hind III* e sondado com a sonda para o gene *gm-hra*.

[0034] A Figura 8 exhibe um experimento de hibridização *Southern* do DNA genômico isolado a partir de tecido foliar de soja de plantas individuais do DP-305423-1 (geração T5 e T4) e do controlo inalterado (Jack), digerido com *Nco I* e sondado com a sonda para o gene *gm-hra*.

[0035] A Figura 9 apresenta um mapa esquemático de sequências contíguas *Contig-1* indicando vários elementos genéticos dentro da inserção-1.

[0036] A Figura 10 apresenta um mapa esquemático de sequências contíguas *Contig-2* indicando vários elementos genéticos dentro da inserção-2.

[0037] A Figura 11 apresenta um mapa esquemático de sequências contíguas *Contig-3* indicando vários elementos genéticos dentro da inserção-3.

[0038] A Figura 12 apresenta um mapa esquemático de sequências contíguas *Contig-4* indicando vários elementos genéticos dentro da inserção-4.

[0039] A Tabela 1 exhibe a descrição das seguintes sequências que estão presentes nas listas de sequências: (1) as sequências inseridas utilizadas para criar o evento DP-305423-1 e os vetores a partir dos quais são derivados; (2), as sequências de DNA genômico presentes nas *Contig-1*, *Contig-2*, *Contig-3* e *Contig-4*; (3), as sequências de junção 5' e 3', nas quais a inserção transgênica e a sequência genômica da soja são unidas, para cada um dos quatro *contigs*; e (4) sequências de *primers* que podem ser utilizados para amplificar as sequências de junção 5' e 3' de cada um dos quatro *contigs*.

TABELA 1**RESUMO DAS SEQ ID NOS.**

SEQ ID NO:	Descrição
1	PHP19340A
2	PHP17752A
3	PHP19340
4	PHP17752
5	DP-305423-1 Contig-1
6	DP-305423-1 Contig-2
7	DP-305423-1 Contig-3
8	Junção 5' Contig-1 20-nt (5' genômico / 5' transgene; 10-nt/10-nt)
9	Junção 3' Contig-1 20-nt (3' genômico / 3' transgene; 10-nt/10-nt)
10	Junção 5' Contig-1 40-nt (5' genômico / 5' transgene; 20-nt/20-nt)
11	Junção 3' Contig-1 40-nt (3' genômico / 3' transgene; 20-nt/20-nt)
12	Junção 5' Contig-1 60-nt (5' genômico / 5' transgene; 30-nt/30-nt)
13	Junção 3' Contig-1 60-nt (3' genômico / 3' transgene; 30-nt/30-nt)
14	Junção 5' Contig-2 20-nt (5' genômico / 5' transgene; 10-nt/10-nt)
15	Junção 3' Contig-2 20-nt (3' genômico / 3' transgene; 10-nt/10-nt)
16	Junção 5' Contig-2 40-nt (5' genômico / 5' transgene; 20-nt/20-nt)

SEQ ID NO:	Descrição
17	Junção 3' Contig-2 40-nt (3' genômico / 3' transgene; 20-nt/20-nt)
18	Junção 5' Contig-2 60-nt (5' genômico / 5' transgene; 30-nt/30-nt)
19	Junção 3' Contig-2 60-nt (3' genômico / 3' transgene; 30-nt/30-nt)
20	Junção 5' Contig-3 20-nt (5' genômico / 5' transgene; 10-nt/10-nt)
21	Junção 3' Contig-3 20-nt (3' genômico / 3' transgene; 10-nt/10-nt)
22	Junção 5' Contig-3 40-nt (5' genômico / 5' transgene; 20-nt/20-nt)
23	Junção 3' Contig-3 40-nt (3' genômico / 3' transgene; 20-nt/20-nt)
24	Junção 5' Contig-3 60-nt (5' genômico / 5' transgene; 30-nt/30-nt)
25	Junção 3' Contig-3 60-nt (3' genômico / 3' transgene; 30-nt/30-nt)
26	05-O-975 Junção 5' Contig-1 <i>primer direto</i>
27	05-O-977 Junção 5' Contig-1 <i>primer reverso</i>
28	05-O-977 Junção 5' Contig-1 <i>probe</i>
29	05-O-1573 Junção 5' Contig-1 <i>primer direto</i>
30	06-O-1487 Junção 5' Contig-1 <i>primer reverso</i>
31	06-O-1414 Junção 3' Contig-1 <i>primer direto</i>
32	06-O-1579 Junção 3' Contig-1 <i>primer reverso</i>
33	06-O-1577 Junção 3' Contig-1 <i>primer direto</i>
34	06-O-1579 Junção 3' Contig-1 <i>primer reverso</i>
35	06-O-1586 Junção 5' Contig-2 <i>primer direto</i>

SEQ ID NO:	Descrição
36	06-O-1585 Junção 5' Contig-2 <i>primer reverso</i>
37	06-O-1404 Junção 3' Contig-2 <i>primer direto</i>
38	06-O-1590 Junção 3' Contig-2 <i>primer direto</i>
39	06-O-1626 Junção 5' Contig-3 <i>primer direto</i>
40	06-O-1366 Junção 5' Contig-3 <i>primer reverso</i>
41	06-O-1569 Junção 3' Contig-3 <i>primer direto</i>
42	06-O-1551 Junção 3' Contig-3 <i>primer reverso</i>
43	06-O-1571 Junção 5' Contig-1 <i>primer direto</i>
44	06-O-1572 Junção 5' Contig-1 <i>primer reverso</i>
45	06-O-1351 Junção 5' Contig-1 <i>primer direto</i>
46	06-O-1367 Junção 5' Contig-1 <i>primer reverso</i>
47	06-O-1357 Junção 3' Contig-1inserção <i>primer direto</i>
48	06-O-1368 Junção 3' Contig-1inserção <i>primer reverso</i>
49	06-O-1369 Junção 3' Contig-1inserção <i>primer reverso</i>
50	06-O-1356 Junção 3' Contig-1inserção <i>primer direto</i>
51	06-O-1371 Junção 3' Contig-1inserção <i>primer reverso</i>
52	06-O-1360 Junção 3' Contig-1inserção <i>primer direto</i>
53	06-O-1423 Junção 3' Contig-1inserção <i>primer reverso</i>
54	06-O-1363 Junção 3' Contig-1inserção <i>primer direto</i>
55	06-O-1421 Junção 3' Contig-1inserção <i>primer direto</i>
56	06-O-1578 Junção 3' Contig-1 <i>primer reverso</i>
57	07-O-1889 região 5' Contig-1 <i>primer direto</i>
58	07-O-1940 Região 5' Contig-1 <i>primer reverso</i>
59	07-O-1892 Região 3' Contig-1 <i>primer reverso</i>
60	07-O-1894 Região 3' Contig-1 <i>primer reverso</i>
61	06-O-1588 Junção 5' Contig-2 <i>primer direto</i>
62	06-O-1403 Junção 5' Contig-2 <i>primer reverso</i>
63	06-O-1592 Junção 3' Contig-2 <i>primer reverso</i>

SEQ ID NO:	Descrição
64	07-O-1895 Região 5' Contig-2 <i>primer direto</i>
65	07-O-1898 Contig-2 5' region reverso primer
66	07-O-1905 Região 3' Contig-2 <i>primer direto</i>
67	07-O-1903 Região 3' Contig-2 <i>primer reverso</i>
68	06-O-1669 Junção 5' Contig-3 <i>primer direto</i>
69	06-O-1426 Junção 5' Contig-3 <i>primer reverso</i>
70	06-O-1355 Junção 3' Contig-3 inserção <i>primer direto</i>
71	06-O-1459 Contig-3 insert reverso primer
72	05-O-1182 Junção 3' Contig-3 <i>primer direto</i>
73	06-O-1672 Junção 3' Contig-3 <i>primer reverso</i>
74	07-O-1881 Região 5' Contig-3 <i>primer direto</i>
75	07-O-1882 Região 5' Contig-3 <i>primer reverso</i>
76	07-O-1886 Região 3' Contig-3 <i>primer direto</i>
77	07-O-1884 Região 3' Contig-3 <i>primer reverso</i>
78	HOS-B Junção 3' <i>primer de inserção Contig-4</i>
79	HOS-B Junção 3' <i>primer reverso Contig-4</i>
80	HOS-C Junção 3' <i>primer reverso Contig-4</i>
81'	HOS-D Junção 3' <i>primer de inserção Contig-4</i>
82	DP-305423-1 Contig-4
83	Junção 5' Contig-4 20-nt (5' genômico / 5' transgene; 10-nt/10-nt)
84	Junção 3' Contig-4 20-nt (3' genômico / 3' transgene; 10-nt/10-nt)
85	Junção 5' Contig-4 40-nt (5' genômico / 5' transgene; 20-nt/20-nt)
86	Junção 3' Contig-4 40-nt (3' genômico / 3' transgene; 20-nt/20-nt)

SEQ ID NO:	Descrição
87	Junção 5' Contig-4 60-nt (5' genômico / 5' transgene; 30-nt/30-nt)
88	Junção 3' Contig-4 60-nt (3' genômico / 3' transgene; 30-nt/30-nt)
89	Junção 5' <i>primer direto</i> Q-PCR Contig-1
90	Junção 5' <i>primer reverso</i> Q-PCR Contig-1
91	Junção 5' <i>sonda</i> Q-PCR Contig-1
92	SAMS-HRA QPCR <i>primer direto</i>
93	SAMS-HRA QPCR <i>primer reverso</i>
94	SAMS-HRA QPCR sonda

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0040] A presente invenção a seguir descrita mais detalhadamente, com referência as figuras anexas, nos quais alguns, mas não todos os exemplos de realização da invenção são exibidos. Na verdade, as invenções descritas no presente podem ser realizadas de diferentes formas e não devem ser entendidos como limitadas apenas aos exemplos de realização descritos no presente, preferencialmente, estes exemplos de realizações são fornecidos de modo que a presente divulgação possa satisfazer requisitos legais aplicáveis.

[0041] Muitas modificações e outros exemplos de realização das invenções aqui estabelecidas virão à mente de um técnico no assunto aos quais estas invenções pertencem com o benefício dos ensinamentos apresentados nas descrições anteriores e nos respectivos desenhos. Portanto, entender-se á que as invenções não estão limitadas aos exemplos de realização específicos divulgados e pretende-se que modificações e outros exemplos de realizações sejam incluídos no escopo das reivindicações anexas.

Embora termos específicos sejam empregados na presente invenção, eles são usados no sentido geral e descritivo, e não para efeitos de limitação.

[0042] As abreviações abaixo são usadas na descrição da presente invenção.

ALS	proteína acetolactato sintase
pb	pares de base
FAD2	proteína microsomal ômega-6 desaturase
<i>gm-fad2-1</i>	gene 1 microsomal ômega-6 desaturase da soja
<i>gm-als</i>	gene acetolactato sintase tipo selvagem da soja
<i>gm-hra</i>	versão modificada do gene da acetolactato sintase
kb soja	Kilobase
PCR	reação em cadeia da polimerase
UTR	região não-traduzida

[0043] São fornecidas composições e métodos relacionados à soja transgênica com alto teor de ácido oleico / tolerante a inibidores de ALS. Especificamente, a presente invenção fornece plantas de soja contendo um evento DP-305423-1. Uma planta de soja com "evento DP-305423-1" foi modificada pela inserção de um cassete de supressão contendo um fragmento de 597 pb do gene 1 microsomal ômega-6 desaturase da soja (*gm-fad2-1*) e um cassete de expressão contendo uma versão modificada do gene acetolactato sintase da soja (*gm-hra*). A inserção da do cassete de supressão *gm-fad2-1* na planta confere um fenótipo de alto teor de ácido oleico. A inserção do gene *gm-hra* produz uma forma modificada da enzima acetolactato sintase (ALS). A ALS é essencial para a biossíntese de aminoácidos de cadeia ramificada e é inibida por certos herbicidas. A alteração no gene *gm-hra* supera essa inibição e fornece assim a tolerância a uma ampla gama de herbicidas inibidores de ALS.

[0044] Assim, uma planta de soja com um evento DP-305423-1 tem um fenótipo de alto teor de ácido oleico e é tolerante a, pelo menos, um herbicida inibidor de ALS.

[0045] Os polinucleotídeos que conferem o fenótipo de alto teor de ácido oleico e resistência ao herbicida inibidor de ALS estão geneticamente ligado ao genoma da soja no evento DP-305423-1 da soja. As plantas de soja abrigando o evento PD-305423-1 compreendem junções genômica / transgene que têm, pelo menos, a sequência de polinucleotídeos de SEQ ID NO: 8, 9, 14, 15, 20, 21, 83, e 84. A caracterização do sítio de inserção genômica do evento DP-305423-1 fornece uma eficiência de reprodução melhorada e permite a utilização de marcadores moleculares para rastrear o transgene inserido nas populações reprodutoras e descendentes destas. São fornecidos no presente vários métodos e composições para a identificação, detecção e a utilização da soja evento DP-305423-1. Conforme utilizado no presente, o termo "evento DP-305423-1 específico" refere-se a uma sequência de polinucleotídeos que é adequada para identificar com discriminação o evento DP-305423-1 em plantas, material vegetal ou em produtos, tais como, mas não se limitando a; alimentos ou produtos para alimentação animal (frescos ou processados) que inclui, ou é proveniente de material vegetal.

[0046] Conforme é utilizado no presente, o termo "soja" refere-se à *Glycine max* e inclui todas as variedades que podem ser cultivadas com a soja. Conforme é utilizado no presente, o termo planta inclui células vegetais, órgãos vegetais, protoplastos vegetais, cultura de células de tecidos vegetais, as quais podem ser regeneradas, calos de vegetais, grumos e células vegetais que estão intactos nas plantas ou partes de plantas, como os embriões, pólen, óvulos, sementes, folhas, flores, ramos, frutos, caules, raízes, ápices radiculares, anteras, e similares. O termo "grão" pretende designar sementes maduras produzidas por agricultores comerciais para outros fins que não o

cultivo ou reprodução da espécie. Progenie, variantes e mutantes das plantas regeneradas estão também incluídos no escopo da presente invenção, desde que essas partes contenham o evento DP-305423-1.

[0047] Um "evento" transgênico é produzido pela transformação de células vegetais com construção(ões) de DNA heterólogo(s), incluindo um cassete de expressão de ácido nucleicos que contém o transgene de interesse, a regeneração de uma população de plantas resultante da inserção do transgene no genoma da planta, e a seleção de uma determinada planta caracterizada pela inserção em um local específico de genoma. Um evento é caracterizado fenotipicamente pela expressão do(s) transgene(s). No nível genético, um evento é parte da composição genética de um vegetal. O termo "evento" também se refere à progênie produzida pelo cruzamento sexuada entre os transformantes e outras variedades que incluem o DNA heterólogo. Mesmo depois de sucessivos cruzamentos de retrógrados com um parental repetido, o DNA inserido e o DNA flanqueado a partir dos parentais transformados estão presentes na progênie do cruzamento na mesma localização cromossômica. O termo "evento" também se refere ao DNA a partir do transformante original compreendendo a sequência de DNA inserido e DNA flanqueado imediatamente adjacentes ao DNA inserido que seria de esperar por ser transferido para um descendente que recebe o DNA inserido, incluindo o transgene de interesse como o resultado de um cruzamento sexual de uma linha parental que contém o DNA inserido (por exemplo, a progênie original e transformante resultante da autopolinização) e uma linhagem parental que não contém o DNA inserido.

[0048] Conforme é utilizado no presente, "DNA inserido" refere-se ao DNA heterólogo no cassete de expressão usados para transformar o material vegetal enquanto que o "DNA flanqueado" pode compreender tanto o DNA genômico, presente naturalmente em um organismo, quanto um DNA de

uma planta estrangeira (heteróloga) introduzida através do processo de transformação que é estranho em relação ao qual não pertence a molécula de DNA original inserida, por exemplo, fragmentos associados com o evento de transformação. Uma "região de flanqueamento" ou "sequência de flanqueamento", como utilizado no presente, refere-se a uma sequência de pelo menos 20, 50, 100, 200, 300, 400, 1000, 1500, 2000, 2500, ou 5000 pares de base ou mais que se encontram tanto imediatamente a montante dos contíguos ou imediatamente a jusante dos contíguos e com a molécula de DNA externa original inserida. Exemplos não limitantes de regiões de flanqueamento do evento DP-305423-1 são apresentados nas SEQ ID NOs: 5, 6, 7, e 82 e variantes e fragmentos destes.

[0049] Os procedimentos de transformação que levam à integração aleatória do DNA estrangeiro resultará em transformantes contendo diferentes regiões de flanqueamento específicas e única para cada transformantes. A "junção" é um ponto onde dois fragmentos de específicos de DNA se unem. Por exemplo, uma junção existe onde um DNA inserido se une ao DNA genômico de flanqueamento. Um ponto de junção existe também em um organismo transformado onde dois fragmentos de DNA se unem de forma que estes sejam modificados a partir do que é encontrado no organismo nativo. Da forma com é utilizado no presente, "junção" refere-se a um DNA que compreende um ponto de junção. Exemplos não limitantes de junções de DNA a partir do evento DP-305423-1 estão são apresentados nas SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, e variantes e fragmentos destes.

[0050] Uma planta DP-305423-1 pode ser gerada por um primeiro cruzamento sexuada com um primeiro parental desenvolvido a partir da soja transgênica DP-305423-1 (ou descendentes destas derivadas da transformação com os cassetes de expressão dos exemplos de realização da

presente invenção que confere resistência ao herbicida) e uma segunda planta de soja parental que carece do fenótipo de tolerância ao herbicida fenótipo, produzindo assim uma variedade de plantas da primeira progênie, e, em seguida, selecionando uma planta da primeira progênie que apresenta a resistência desejada ao herbicida; e auto polinizando a primeira progênie de plantas, produzindo assim uma variedade de segunda progênie de plantas, e, em seguida, selecionando a partir da segunda progênie de plantas que exibem a resistência ao herbicida desejada. Estes passos podem ainda incluir um cruzamento de retrógrado de uma primeira progênie resistente a herbicida ou a uma segunda progênie resistente a herbicida com uma segunda planta de soja parental ou uma terceira planta de soja parental, produzindo assim uma planta de soja que apresenta a tolerância desejada ao herbicida. Reconhece-se adicionalmente que a avaliação das progênies pelo fenótipo não é necessário. Vários métodos e composições, além do divulgados no presente, podem ser usados para detectar e/ou identificar o evento DP-305423-1.

[0051] Entende-se também que duas plantas transgênicas diferentes podem ser submetidas ao cruzamento para produzir descendentes que contêm dois genes exógenos acrescentados independentemente separados. Autopolinização da progênie adequada pode produzir plantas que são homozigotas para ambos genes exógenos acrescentados. O cruzamento de retrógrado para uma planta parental e o fluxo gênico com uma planta não-transgênica são também contemplados, como sendo propagações vegetativas. Descrições de outros métodos de reprodução que são comumente usados para diferentes características e culturas podem ser encontradas em uma das várias referências, por exemplo, em Fehr, em *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcos J. ed., *American Society of Agronomy*, Madison (1987).

[0052] Um pedido particularmente útil da invenção reivindicada é combinar o traço de alto teor de ácido oleico do evento DP-305423-1 com

outras linhagens de soja que tenham composições alteradas de ácidos graxos, para se obter linhagens de progênie com novas composições de ácidos graxos e/ou características agronômicas melhoradas. Outras linhagens de soja podem ser linhagens mutantes, linhagens transgênicas ou linhagens transgênicas que também compreendem um gene mutado. Os transgenes do DP-305423-1 podem ser combinados com outros genes mutantes ou transgenes, quer seja através do cruzamento ou pela transformação de outras linhagens de soja com a construção de DNA recombinante da presente invenção.

[0053] Como exemplos, a característica de alto teor de ácido oleico da invenção pode ser combinada com uma linhagem mutante com um fenótipo de alto teor de ácido esteárico, como a soja da linhagem A6 [Hammond, EG e Fehr, WR (1983)] ou com uma linhagem mutante possuindo um fenótipo de baixa teor de ácido linolênico, como a linhagem de soja mutante A5, A23, A16 e C1640 [Fehr, WR *et al.* (1992) em *Crop Science* 32:903-906]. Os óleos produzidos a partir de tais combinações poderiam proporcionar melhores matérias-primas para produção de margarinas, gorduras técnicas (*shortenings*), spray de revestimento e óleos de fritura e poderia eliminar ou reduzir a necessidade de hidrogenação. Além disso, estes óleos proporcionariam um benefício para a saúde dos consumidores, por exemplo, reduzindo ou eliminando os ácidos graxos trans, que revelaram estar associados com o aumento de risco para doenças cardiovasculares.

[0054] As características de alto teor de ácido oleico podem ser combinadas com linhagens mutantes que possuem um fenótipo de alto teor de ácido oleico. Exemplos de linhagens mutantes de alto teor de ácido oleico incluem as linhagens A5 e N782245 [Martin, B. A. e Rinne, R. W. (1985) *Crop Science* 25:1055-1058].

[0055] Conforme utilizado no presente, o termo "polinucleotídeo" não pretende limitar a presente invenção a polinucleotídeos compreendendo

DNA. Os técnicos do assunto reconhecerão que polinucleotídeos, pode incluir ribonucleotídeos e combinações de ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos. Tais moléculas de ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos incluem tanto as moléculas de ocorrência naturalmente quanto os análogos sintéticos. Os polinucleotídeos da presente invenção também abrangem todas as formas de sequências, incluindo, mas não se limitando a, formas de fita simples, formas de fitas duplas, em grampo, formas em "*stem-and-loop*", e similares.

[0056] Uma planta DP-305423-1 contém um cassete de supressão contendo um fragmento de 597 pb do gene 1 microssomal ômega-6 desaturase da soja (*gm-fad2-1*) e um cassete de expressão contendo uma versão modificada do gene acetolactato sintase da soja (*gm-hra*). O cassete pode incluir sequências reguladoras 5' e 3' operacionalmente ligadas aos polinucleotídeos *gm-fad2-1* e *gm-hra*. "Operacionalmente ligado" destina-se a designar uma ligação funcional entre dois ou mais elementos. Por exemplo, um operacionalmente ligado entre um polinucleotídeo de interesse e uma sequência reguladora (ou seja, um promotor) é uma ligação funcional que permite a expressão do polinucleotídeo de interesse. Elementos operacionalmente ligados podem ser contíguos ou não contíguos. Quando utilizados para referir-se à união de duas regiões codificadoras de proteínas, por operacionalmente ligado pretende-se dizer que as regiões codificantes estão no mesmo quadro de leitura. O cassete pode também conter, pelo menos, um gene adicional a ser co-transformado no organismo. Alternativamente, o(s) gene(s) adicional(ais) pode(m) ser fornecido(s) em múltiplos cassetes de expressão. Da mesma forma, um cassete de expressão é fornecido com uma variedade de sítios de restrição enzimática e/ou sítios de recombinação para a inserção de polinucleotídeos para estarem sob a regulação transcricional das regiões reguladoras. Os cassetes de expressão podem também conter genes marcadores selecionáveis.

[0057] O cassete de expressão irá incluir na direção 5' - 3' de transcrição, uma região de iniciação transcricional e translacional (ou seja, um promotor), uma região codificadora, e um região de término transcricional e translacional funcional em plantas. "Promotor" refere-se a uma sequência nucleotídica capaz de controlar a expressão de uma sequência codificante ou RNA funcional. Em geral, uma codificação sequência está localizado 3' a uma sequência promotora. A sequência promotora pode incluir elementos à montante proximais e mais distais, os últimos elementos são muitas vezes referidos como amplificadores. Assim, um "amplificador" é uma sequência nucleotídica que pode estimular a atividade promotora e pode ser um elemento inato do promotor ou um elemento heterólogo inserido para aumentar o nível ou especificidade tecidual do promotor. Os promotores podem ser derivados de sua totalidade a partir de um gene nativo, ou ser composto de vários elementos provenientes de diferentes promotores encontrados na natureza, ou mesmo incluir segmentos sintéticos de nucleotídeos. É evidente por aqueles qualificados na arte que diferentes promotores podem controlar a expressão de um gene em diferentes tecidos ou tipos de células, ou, em diferentes fases do desenvolvimento, ou em resposta a diferentes condições ambientais. Promotores que causam um fragmento de ácido nucleico para ser expresso na maioria dos tipos celulares são comumente referidos na maioria das vezes como "promotores constitutivos". Novos promotores úteis para vários tipos de células vegetais estão constantemente sendo descobertas; inúmeros exemplos podem ser encontrados na compilação por Okamura e Goldberg (1989) *Biochemistry of Plants* 15: 1-82. É ainda reconhecido que, uma vez que na maioria dos casos, os limites exatos das sequências reguladoras não foram completamente definidos, fragmentos de ácido nucleico de diferentes comprimentos podem ter atividade promotora idêntica.

[0058] Os cassetes de expressão podem também conter sequências líderes 5'. Tais sequências líderes podem agir para aumentar a tradução. As regiões reguladoras (ou seja, promotores, regiões de regulação transcricionais, regiões de transformação ou a estabilidade do RNA, íntrons, sinais de poliadenilação e regiões de término translacional) e/ou a região codificadora podem ser nativas/análogas ou heterólogas à célula hospedeira ou umas as outras.

[0059] A "sequência líder translacional" refere-se a uma sequência nucleotídica localizada entre a sequência promotora de um gene e a sequência codificante. A sequência líder de tradução está presente no mRNA totalmente processado a montante da sequência de início de tradução. A sequência líder translacional pode afetar numerosos parâmetros, incluindo, o processamento da transcrição primária do mRNA, estabilidade do mRNA e/ou eficiência da tradução. Exemplos de sequências líder de tradução foram descritas (Turner e Foster (1995) *Mol. Biotechnol.* 3: 225-236). As "sequências 3' não codificante" referem-se a sequências de nucleotídeos localizados a jusante de uma sequência codificadora e inclui uma sequência de reconhecimento de poliadenilação e outras sequências que codificam sinais reguladores da codificação capazes de afetar o processamento do mRNA ou a expressão gênica. O sinal de poliadenilação é normalmente caracterizado por afetar a adição de tratos de ácido poliadenílico na extremidade 3' do precursor do mRNA. A utilização de diferentes sequências 3' não codificante é exemplificada por Ingelbrecht *et al.* (1989) *Plant Cell* 1: 671-680.

[0060] Da forma com é utilizado no presente, o termo "heterólogos" quando se refere a uma sequência, é uma sequência que provém de outra espécie, ou, quando da mesma espécie, é substancialmente modificada da sua forma nativa em sua composição e/ou *locus* no genoma deliberado pela intervenção humana. Por exemplo, um promotor operacionalmente ligado a um polinucleotídeo heterólogo é de uma espécie

diferente da espécie dos quais o polipeptídeo é originado, ou, se a partir da mesma/análoga espécie, um ou ambos são substancialmente modificados a partir de sua forma original e/ou *locus* genômico, ou o promotor não é o promotor nativo para o polinucleotídeo operacionalmente ligado.

[0061] Ao preparar o cassete de expressão, os vários fragmentos de DNA podem ser manipulados de modo a fornecer a sequências de DNA em uma orientação correta e, se necessário, com o quadro de leitura apropriado. Com esta finalidade, adaptadores ou ligantes podem ser empregados para se unir fragmentos de DNA ou outras manipulações podem estar envolvidas para fornecer sítios de restrições convenientes, remoção de DNA supérfluo, eliminação de sítios de restrições, ou coisas do gênero. Para este propósito, a mutagênese *in vitro*, reparação por *primers*, restrição, anelamento, por exemplo, transições e traduções, podem estar envolvidas. Os cassetes de expressão podem também conter genes marcadores selecionáveis para a seleção das células transformadas. Marcadores de genes selecionáveis são utilizados para a seleção de células transformadas.

[0062] São fornecidos polinucleotídeos isolados que podem ser utilizados em vários métodos para a detecção e/ou identificação da soja evento DP-305423-1. Um polinucleotídeo "isolado" ou "purificado", ou parte dele biologicamente ativa, é substancialmente ou essencialmente livre de componentes que normalmente acompanham ou interagem com os polinucleotídeos encontrados em seu ambiente natural. Assim, um polinucleotídeo isolado ou purificado é substancialmente livre de outros materiais celulares, ou meio de cultura, quando produzidas por técnicas recombinantes, ou substancialmente livres de precursores químicos ou outros produtos químicos quando sintetizados quimicamente. De modo mais eficiente, um polinucleotídeo "isolado" é isento de sequências (sequências que codificam proteínas eficientemente) que naturalmente flanqueiam os polinucleotídeos

(isto é, sequências localizadas na extremidade 5' e 3' dos polinucleotídeos) no DNA genômico do organismo a partir do qual o polinucleotídeo é derivado. Por exemplo, em vários exemplos de realização, o polinucleotídeo isolado pode conter menos de cerca de 5 KB, 4 KB, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, ou 0,1 kb de sequência nucleotídica que flanqueia naturalmente os polinucleotídeos no DNA genômico da célula a partir da qual o polinucleotídeo é derivado.

[0063] Em exemplos de realização específicos, os polinucleotídeos da presente invenção compreendem a sequência de junção do DNA estabelecidas nas SEQ ID NOs: 8, 9, 14, 15, 20, 21, 83 ou 84. Em outros exemplos de realização, polinucleotídeos da presente invenção compreendem a sequência de junção do DNA estabelecidas nas SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88 ou variantes e fragmentos destes. Fragmentos e variantes de sequências de junção de DNA são adequados para identificar de maneira discriminativa o evento DP-305423-1. Como discutido a seguir, tais sequências encontram seus usos como *primers* e/ou sondas.

[0064] Em outro exemplo de realização, é uma construção de expressão de DNA compreendendo um polinucleotídeo isolado da invenção operacionalmente ligado a pelo menos uma sequência reguladora.

[0065] Em outro exemplo de realização, é uma construção de DNA recombinante compreendendo: um primeiro e segundo cassete de expressão, em que o primeiro cassete de expressão no operacionalmente ligado compreende: (a) um promotor da soja KTi3; (b) um fragmento *gm-fad2-1*, e (c) um terminador transcricional da soja KTi3; e o segundo cassete de expressão mencionado incluído, no operacionalmente ligado: (i) um promotor SAMS da soja, (ii) um líder SAMS 5' não traduzido e um intron e, (iii) uma molécula de DNA codificante de GM-HRA da soja, e (iv) um terminador transcricional als da soja.

[0066] Outro exemplo de realização é uma planta de soja transgênica possuindo o polinucleotídeo ou DNA recombinante da invenção, integrado estavelmente em seu genoma, e as sementes transgênicas e progênes transgênicas derivadas destas plantas de soja transgênica, cada uma contendo também os polinucleotídeos ou construção de DNA recombinante da invenção.

[0067] Em outro exemplo de realização, os polinucleotídeos da presente invenção compreendem polinucleotídeos que podem detectar um evento DP-305423-1 ou uma região específica do DP-305423-1. Essas sequências incluem qualquer polinucleotídeos estabelecidos nas SEQ ID NOs:1-94 ou variantes e fragmentos destas. Fragmentos e variantes de polinucleotídeos que detectam um evento DP-305423-1 ou uma região específica do DP-305423-1 são adequados para identificar de maneira discriminada o evento DP-305423-1. Como discutido a seguir, tais sequências encontram seus usos como *primers* e/ou sondas. São adicionalmente fornecidos sequências de primers de nucleotídeos de DNA compreendendo ou consistindo das sequências estabelecidas nas SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 93 ou 94 ou complemento destas.

[0068] O termo "variante" significa sequências substancialmente semelhantes. Para polinucleotídeos, um variante que inclui um polinucleotídeo que contem deleções (ou seja, trunicações) na extremidade 5' e/ou 3'; deleção e/ou adição de um ou mais nucleotídeos em um ou mais sítios internos no polinucleotídeo nativo e/ou; substituição de um ou mais nucleotídeo em um ou mais sítios no polinucleotídeo nativo.

[0069] Conforme utilizado no presente, uma "sonda" é um isolado polinucleotídeo ao qual é anexado um marcador convencional detectável ou molécula repórter, por exemplo, um isótopo radioativo, ligante, agente quimioluminescente, enzimas e etc. Essa sonda é complementar a uma fita de um polinucleotídeo alvo, no caso da presente invenção, a uma fita de DNA isolado a partir do evento DP-305423-1 da soja ou a partir de uma amostra de DNA, que inclui o evento. Sondas, de acordo com a presente invenção incluem não apenas ácidos desoxirribonucleicos ou ribonucleico, mas também poliamidas e outros materiais de sondas que possam detectar especificamente a presença da sequência do DNA alvo.

[0070] Conforme utilizado no presente, "*primers*" são polinucleotídeos isolados que são anelados à fita complementar do DNA alvo pela hibridização dos ácidos nucleicos para formar um híbrido entre o *primer* e a fita de DNA alvo e, em seguida, estendo ao longo da fita de DNA alvo por uma enzima polimerase, por exemplo, uma DNA polimerase. Pares de *primers* da invenção referem-se a sua utilização para a amplificação de um polinucleotídeo alvo, por exemplo, pela reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional ou outros métodos de amplificação de ácidos nucleicos. "PCR" ou "reação em cadeia da polimerase" é uma técnica utilizada para a amplificação de segmentos específicos do DNA (vide, Patente US 4.683.195 e US 4.800.159; incorporadas ao presente pela referência). Qualquer combinação de *primers* divulgados no presente podem ser utilizados de modo que os pares de *primers* permitam a detecção de um evento DP-305423-1 ou região específica. Exemplos não limitando de pares de *primers* incluem SEQ ID NOs: 26 e 27; SEQ ID NOs: 29 e 30; SEQ ID NOs: 31 e 32; SEQ ID NOs: 33 e 34; SEQ ID NOs: 35 e 36; SEQ ID NOs: 37 e 38; SEQ ID NOs: 39 e 40; SEQ ID NO: 41 e 42; SEQ ID NOs: 43 e 44; SEQ ID NOs: 45 e 46; SEQ ID NOs: 47 e 48; SEQ ID NSA: 47 e 49; SEQ ID NOs: 50 e 51; SEQ ID NOs: 52 e 53; SEQ ID NOs: 54 e

49; SEQ ID NOs: 55 e 46; SEQ ID NOs: 33 e 56; SEQ ID NOs: 57 e 58; SEQ ID NOs: 59 e 60; SEQ ID NOs: 61 e 36; SEQ ID NOs: 35 e 62; SEQ ID NOs: 37 e 63; SEQ ID NOs: 64 e 65; SEQ ID NOs: 66 e 67; SEQ ID NOs: 68 e 69; SEQ ID NOs: 70 e 71; SEQ ID NOs: 72 e 73; SEQ ID NOs: 74 e 75; SEQ ID NOs: 76 e 77; SEQ ID NOs: 78 e 79; SEQ ID NOs: 80 e 81; e SEQ ID NOs: 89 e 90.

[0071] Sondas e *primers* são de um comprimento suficiente de nucleotídeos para se ligar a sequência de DNA alvo e detectar especificamente e/ou identificar um polinucleotídeo possuindo um evento DP-305423-1. É reconhecido que as condições de hibridização ou condições de reação podem ser determinadas pelo operador para alcançar este resultado. Este comprimento pode ser qualquer comprimento que seja suficiente para ser útil em um método de detecção de escolha. Geralmente, são utilizados 8, 11, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 nucleotídeos de comprimento ou mais, ou entre cerca de 11-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800 nucleotídeos de comprimento ou mais. Essas sondas e *primers* podem hibridizar especificamente uma sequência alvo e condições de hibridização de alta estrinência. Sondas e *primers* de acordo com os exemplos de realização da presente invenção podem ter uma identidade completa na sequência do DNA de nucleotídeos contíguos com a sequência alvo, embora sondas diferentes da sequência de DNA alvo que mantêm a capacidade de detectar especificamente e/ou identificar uma sequência de DNA alvo possam ser desenvolvidas por métodos convencionais. Assim, sondas e *primers* podem compartilhar cerca de 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade na sequência ou complementaridade ao polinucleotídeo alvo (ou seja, SEQ ID NO:1-94), ou pode se diferir da sequência alvo (ou seja, SEQ ID NO :1-94) por 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou mais nucleotídeos. Sondas podem ser

utilizadas como *primers*, mas são geralmente desenvolvidas para se ligar ao DNA ou RNA alvo e não são utilizadas em um processo de amplificação.

[0072] *Primers* específicos podem ser utilizados para amplificar um fragmento inteiro para produzir um fragmento amplificado que pode ser usado como uma "sonda específica", ou ele próprio pode ser detectado para a identificação do evento DP-305423-1 em amostras biológicas. Alternativamente, uma sonda da invenção pode ser utilizada durante a reação de PCR para permitir a detecção da amplificação do evento (ou seja, uma sonda *taqman*). Quando a sonda é hibridizada com o polinucleotídeo de uma amostra biológica em condições que permitam a ligação da sonda com a amostra, esta ligação pode ser detectada e, permitindo assim, uma indicação da presença de evento DP-305423-1 nas amostras biológicas. Essa identificação de uma sonda ligada já foi descrita no estado da técnica. Em um exemplo de realização da invenção, a sonda específica é uma sequência que, sob condições otimizadas, hibridiza especificamente em uma região dentro da região de flanqueamento 5' ou 3' do evento e também inclui uma parte do DNA estrangeiro contíguo com este. A sonda específica pode compreender uma sequência com identidade (ou complementar) de pelo menos 80%, entre 80 e 85%, entre 85 e 90%, entre 90 e 95% e entre 95 e 100% com uma região específica do evento DP-305423-1.

[0073] Conforme utilizado no presente, "DNA amplificado" ou "*amplicon*" refere-se ao produto da amplificação de um polinucleotídeo de um polinucleotídeo alvo que faz parte de um molde de ácido nucleico. Por exemplo, para determinar se uma planta de soja resultante de um cruzamento sexuado contém o evento DP-305423-1, o DNA extraído de uma amostra de tecido vegetal da soja pode ser submetido a um método de amplificação do DNA utilizando um par de *primers* que inclui um primeiro *primer* derivado da sequência de flanqueamento adjacente ao local de inserção do DNA heterólogo

inserido, e um segundo *primer* derivado do DNA heterólogo inserido para produzir um fragmento amplificado que é diagnóstico para a presença do DNA do evento DP-305423-1. Para o "diagnóstico" de um evento DP-305423-1, a utilização de qualquer método ou teste que discrimine entre a presença ou a ausência de um evento DP-305423-1 em uma amostra biológica é pretendida. Alternativamente, o segundo *primer* pode ser obtido a partir da sequência de flanqueamento. Em outros exemplos de realização adicionais, pares de primers podem ser derivados de sequências de flanqueamento de ambos os lados do ADN inserido, a fim de produzir um fragmento amplificado que inclui toda a inserção da construção do polinucleotídeo de expressão, bem como a sequência que flanqueia a inserção transgênica. O fragmento amplificado é de um comprimento e possui uma sequência que é também diagnóstica para o evento (ou seja, tem uma junção de DNA a partir do evento DP-305423-1). O *amplicon* pode variar de comprimento a partir do comprimento combinado dos pares de *primers* acrescido de um par de base de nucleotídeo até qualquer comprimento de *amplicon* produzido por um protocolo de amplificação de DNA. Um membro de um par de *primer* derivado da sequência de flanqueamento pode ser localizado a uma distância da sequência de DNA inserido, essa distância pode variar em cerca de um par de base de nucleotídeo até aos limites da reação de amplificação, ou cerca de vinte mil pares de bases de nucleotídeos. A utilização do termo "*amplicon*" ou "fragmento amplificado" exclui especificamente os dímeros de primers que podem ser formados na reação de amplificação térmica do DNA.

[0074] Métodos de preparação e utilização de sondas e iniciadores são descritos, por exemplo, em *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2º suplemento, vol. 1-3, Ed. Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1989 (a seguir "Sambrook *et al.* 1989"); *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel *et al.*, Greene

Publishing e *Wiley-Interscience*, Nova Iorque, 1992 (com atualizações periódicas) (a seguir "Ausubel *et al.*, 1992"); e Innis *et al.*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press: San Diego, 1990. Pares de *primers* para PCR podem ser derivados de uma sequência conhecida, por exemplo, utilizando os programas de computador destinados para essa finalidade, como a ferramenta de análise de *primers* para PCR em Vector NTI versão 6 (Informax Inc., Bethesda Md.); *PrimerSelect* (DNASTAR Inc., Madison, Wis.) e *Primer* (Versão 0.5.COPYRIGHT. de 1991, *Whitehead Institute for Biomedical Research*, Cambridge, Mass). Adicionalmente, a sequência pode ser digitalizada e os *primers* identificados manualmente utilizando as diretrizes conhecidas pelos técnicos do assunto.

[0075] Deve entender-se que da forma como é utilizado no presente, o termo "transgênico" inclui qualquer célula, linhagem celular, calos, tecidos, plantas ou parte de plantas, o genótipo ao qual tenha sido alterado pela presença de ácido nucleico heterólogo incluindo os transgênicos inicialmente alterados, bem como aqueles criados pela troca de material genético de maneira sexuada ou propagação assexuada dos transgênicos iniciais. O termo "transgênico", da forma com é utilizado no presente, não engloba alterações do genoma (cromossômicas ou extra-cromossômicas) por métodos convencionais de melhoramento genético de vegetais por reprodução que ocorrem naturalmente ou por eventos aleatórios, tais como fertilização cruzada, infecção viral não recombinante, transformação por bactéria não recombinante, transposição não recombinante ou mutação espontânea.

[0076] "Transformação" refere-se à transferência de um fragmento de ácido nucleico para o genoma de um organismo hospedeiro, resultando em uma herança geneticamente estável. Organismos hospedeiros contendo os fragmentos de ácido nucleico transformado são referidos como organismos "transgênicos". Exemplos de métodos de transformações de vegetais inclui a

transformação mediada pelo *Agrobacterium* (De Blaere *et al.* (1987) *Meth. Enzymol.* 143: e aceleração de partículas ou tecnologia de transformação por biobalística "*gene gun*" (Klein *et al.* (1987) *Nature* (London) 327: 70-73, Patente US 4.945.050; incorporada ao presente pela referência. Métodos de transformações adicionais estão descritas abaixo.

[0077] Assim, polinucleotídeos isolados da presente invenção pode ser incorporado em construções recombinantes, normalmente construções de DNA, que são capazes de serem introduzidos e se replicarem em uma célula hospedeira. Essa construção pode ser um vetor que inclui um sistema de replicação e sequências que são capazes de realizar a transcrição e tradução de uma sequência que codifica um polipeptídeo em uma dada célula hospedeira. Uma variedade de vetores adequados para a transfecção estável de células vegetais ou para o estabelecimento de plantas transgênicas foi descrita em, por exemplo, Pouwels *et al.* (1985; Supp. 1987) *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Weissbach e Weissbach (1989) *Methods for Plant Molecular Biology* (Academic Press, Nova Iorque); e Flevin *et al.* (1990) *Plant Molecular Biology Manual* (Kluwer Academic Publishers). Normalmente, vetores de expressão vegetais, por exemplo, um ou mais genes de plantas clonadas sob o controle transcricional de uma sequência reguladora 5' e 3' e um marcador de seleção dominante. Tais cassetes de expressão vegetal podem também conter uma região de regulação promotora (por exemplo, um que confere uma expressão induzível ou constitutiva, regulada pelo ambiente ou regulada pelo desenvolvimento, ou específica para um tecido ou célula), uma local de início de transcrição, um sítio de ligação do ribossomo, um sinal de processamento do RNA, um sítio de término de transcrição e/ou um sinal de poliadenilação.

[0078] São fornecidos vários métodos e composições para identificar o evento PD-305423-1. Tais métodos encontram sua utilização na

identificação e/ou detecção do evento DP-305423-1 em qualquer material biológico. Esses métodos incluem, por exemplo, métodos para confirmar a pureza das sementes e métodos para rastrear sementes com o evento DP-305423-1 evento em um lote de sementes. Em um exemplo de realização, é fornecido um método para identificar o evento DP-305423-1 em uma amostra biológica e compreende em contatar a amostra com um primeiro e um segundo *primer*, e amplificar um polinucleotídeo que contém uma região específica do DP-305423-1.

[0079] Uma amostra biológica pode compreender uma amostra na qual se deseja determinar a presença do evento DP-305423-1 no DNA. Por exemplo, uma amostra biológica pode incluir qualquer material vegetal ou material contendo ou derivado de um material vegetal, tais como, mas não se limitando a, alimentos ou produtos para alimentação animal. Conforme utilizado no presente, "material vegetal" refere-se a um material que é obtido ou derivado de uma planta ou parte desta. Em um exemplo de realização específico, a amostra biológica pode compreender um tecido de soja.

[0080] *Primers* e sondas baseadas nas sequências de DNA de flaqueamento e inseridas divulgados no presente podem ser utilizadas para confirmar (e, se necessário, corrigir) as sequências divulgadas pelos métodos convencionais, por exemplo, re-clonagem e sequenciamento dessas sequências. As sondas e primers polinucleotídicas da presente invenção detectam especificamente uma sequência de DNA alvo. Qualquer método convencional de hibridização ou amplificação de ácidos nucleicos pode ser utilizado para identificar a presença de DNA de um evento transgênico em uma amostra. Pelo termo "detectar especificamente" pretende-se dizer que o polinucleotídeo pode ser utilizado como um *primer* para amplificar uma região específica do DP-305423-1 ou o polinucleotídeo pode ser usado como uma sonda que hibridiza sob condições estridentes em um polinucleotídeo que

possuí um evento PD-305423 -1 ou em uma região específica da PD-305423-1. O nível ou grau de hibridização específica que permite a detecção de um evento DP-305423-1 ou de uma região específica do evento DP-305423-1 é suficiente para distinguir o polinucleotídeo com uma região específica do DP-305423-1 de um polinucleotídeo que não possui essa região e permitindo, assim, a identificação do evento DP-305423-1 de maneira discriminada. Pelo termo "compartilhar suficiente identidade ou complementaridade da sequência para permitir a amplificação de um evento DP-305423-1 específico" refere-se a sequências que compartilham, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade ou complementaridade em um fragmento ou em todo o comprimento do polinucleotídeo com determinada região do DP-305423-1.

[0081] Com relação à ampliação de um polinucleotídeo alvo (por exemplo, por PCR), utilizando um par de *primer* de amplificação específico, "condições estridentes" são as condições que permitem o par de *primers* hibridizar ao polinucleotídeo alvo para o qual o *primer* tem a sequência correspondente do tipo selvagem (ou seu complemento) podendo se ligar, e preferencialmente produzir um produto de amplificação identificável (o *amplicon*), possuindo uma região específica DP-305423-1 na reação de amplificação térmica do DNA. Em um método de PCR, os *primers* oligonucleotídicos podem ser projetados para serem utilizados nas reações de PCR para amplificar uma região específica do DP-305423-1. Métodos para se projetar *primers* para PCR e PCR de clonagem são geralmente conhecidas no estado da técnica e são divulgadas em Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nova Iorque). Vide também, Innis *et al.*, eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Nova Iorque); Innis e Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, Nova Iorque); e Innis

and Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, Nova Iorque). Métodos de amplificação estão adicionalmente descritos nas Patentes US 4.683.195, US 4.683.202 e Chen *et al.* (1994) *PNAS* 91:5695-5699. Estes métodos, bem como outros métodos conhecidos no estado da arte da amplificação do DNA podem ser utilizados na prática dos exemplos de realização da presente invenção. Compreende-se que certo número de parâmetros em um protocolo de PCR específico poderá necessitar de ser ajustado para as condições específicas do laboratório e poderá ser ligeiramente modificado e ainda assim permitir a coleta de resultados semelhantes. Estes ajustes serão evidentes para um técnico hábil no assunto.

[0082] O polinucleotídeo amplificado (*amplicon*) pode ser de qualquer comprimento que permita a detecção do evento DP-305423-1 ou uma região específica do DP-305423-1. Por exemplo, o fragmento amplificado pode ser de cerca de 10, 50, 100, 200, 300, 500, 700, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 nucleotídeos de comprimento ou mais.

[0083] Em determinados exemplos de realização, a região específica do evento DP-305423-1 é detectada.

[0084] Qualquer *primer* pode ser utilizado nos métodos da presente invenção de modo que permita que a região específica DP-305423-1 seja amplificada ou detectada. Por exemplo, em exemplos de realização específicos, o primeiro *primer* compreende um fragmento de um polinucleotídeo de SEQ ID NOs: 5, 6, 7 ou 82, em que o primeiro ou o segundo *primer* compartilha uma identidade de sequência ou complementaridade suficiente com o polinucleotídeo para amplificar a região específica DP-305423-1. O par *primer* pode compreender um primeiro *primer* que inclui um fragmento de uma região genômica 5' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, e um segundo *primer* que compreende um fragmento de uma região genômica 3' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, ou uma região de inserção de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82 ou,

alternativamente, o par de *primer* que compreende um fragmento de uma região genômica 3' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, e um segundo *primer* que compreende um fragmento de uma região genômica 5' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, ou uma região de inserção de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82. Em exemplos de realizações adicionais, o primeiro e o segundo *primer* pode incluir qualquer um ou qualquer combinação das sequências estabelecidas na SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 93 ou 94. Os *primers* podem ser de qualquer comprimento que suficiente para amplificar uma região DP-305423-1, incluindo, por exemplo, pelo menos, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 15 ou 30 ou cerca de 7-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 nucleotídeos ou mais.

[0085] Tal como discutido em outras seções na presente invenção, qualquer método de PCR para amplificar o evento DP-305423-1 ou região específica pode ser empregado, incluindo, por exemplo, o PCR em tempo real. Vide, por exemplo, Livak *et al.* (1995a). Oligonucleotídeos com corantes fluorescentes nas extremidades opostas fornecem um sistema de sonda apagada para detectar o produto da PCR e hibridização de ácidos nucleicos. Métodos e aplicações da PCR. 4:357-362; Patente US 5.538.848; Patente US 5.723.591; Manual do usuário da *Applied Biosystems* Nº. 2, "Relative Quantitation of Gene Expression" P/N 4303859; e Manual do usuário da *Applied Biosystems* Nº5, "Multiplex PCR with Taqman VIC probes" P/N 4306236; os quais são incorporados ao presente pela referência.

[0086] Assim, em outro exemplo de realização, um método para a detecção da presença de soja evento DP-305423-1 ou progênies destas em uma amostra biológica é fornecida. O método inclui (a) a extração de uma amostra de DNA a partir da amostra biológica. (b) fornecer um par de *primers*

de moléculas de DNA, incluindo, mas não limitados a, i) sequências que compreende as SEQ ID NO: 26 e SEQ ID NO: 27. ii) sequências que compreende as SEQ ID NO: 29 e SEQ ID NO: 30. iii) sequências que compreende as SEQ ID NO: 31 e SEQ ID NO: 32. iv) sequências que compreende as SEQ ID NO: 33 e SEQ ID NO: 34. v) sequências que compreende as SEQ ID NO: 35 e SEQ ID NO: 36. vi) sequências que compreende as SEQ ID NO: 37 e SEQ ID NO: 38. vii) sequências que compreende as SEQ ID NO: 39 e SEQ ID NO: 40. viii) sequências que compreende as SEQ ID NO: 41 e SEQ ID NO: 42. ix) sequências que compreende as SEQ ID NO: 43 e SEQ ID NO: 44. x) sequências que compreende as SEQ ID NO: 45 e SEQ ID NO: 46. xi) sequências que compreende as SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 48. xii) sequências que compreende as SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 49. xiii) sequências que compreende as SEQ ID NO: 50 e SEQ ID NO: 51. xiv) sequências que compreende as SEQ ID NO: 52 e SEQ ID NO: 53. xv) sequências que compreende as SEQ ID NO: 54 e SEQ ID NO: 49. xvi) sequências que compreende as SEQ ID NO: 55 e SEQ ID NO: 46. xvii) sequências que compreende as SEQ ID NO: 33 e SEQ ID NO: 56. xviii) sequências que compreende as SEQ ID NO: 57 e SEQ ID NO: 58. xix) sequências que compreende as SEQ ID NO: 59 e SEQ ID NO: 60. xx) sequências que compreende as SEQ ID NO: 61 e SEQ ID NO: 36. xxi) sequências que compreende as SEQ ID NO: 35 e SEQ ID NO: 62. xxii) sequências que compreende as SEQ ID NO: 37 e SEQ ID NO: 63. xxiii) sequências que compreende as SEQ ID NO: 64 e SEQ ID NO: 65. xxiv) sequências que compreende as SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67. xxv) sequências que compreende as SEQ ID NO: 68 e SEQ ID NO: 69. xxvi) sequências que compreende as SEQ ID NO: 70 e SEQ ID NO: 71. xxvii) sequências que compreende as SEQ ID NO: 72 e SEQ ID NO: 73. xxviii) sequências que

compreende as SEQ ID NO: 74 e SEQ ID NO: 75. xxix) sequências que compreende as SEQ ID NO: 76 e SEQ ID NO: 77. xxx), o que inclui sequências que compreende as SEQ ID NO: 78 e SEQ ID NO: 79. xxxi) sequências que compreende as SEQ ID NO: 80 e SEQ ID NO: 81. e xxxii) sequências que compreende as SEQ ID NO: 89 e SEQ ID NO: 90 (c) fornecer condições para a reação da amplificação do DNA. (c) fornecer condições para a reação de amplificação do DNA; (d) realizar a reação de amplificação do DNA mencionada, produzindo assim uma molécula de DNA amplificada, e (e) detectando a molécula do fragmento de DNA amplificado, em que a detecção da molécula de DNA amplificada mencionada indica a presença de da soja evento DP-305423-1. Para que uma molécula de ácido nucleico sirva como um *primer* ou sonda basta que esta seja suficientemente complementar na sequência para poder formar uma estrutura estável de dupla fita sob uma concentração específica de solvente e sal empregada.

[0087] Nas técnicas de hibridização, todos ou parte dos polinucleotídeos que seletivamente hibridizam o polinucleotídeo alvo possuindo um evento específico DP-305423-1 é utilizado. A expressão "condições estridentes" ou "condições de hibridização estridentes" quando se refere a condições onde se pretende que uma sonda polinucleotídica irá hibridizar e detectar a sua sequência alvo em um grau mais elevado do que a de outras sequências (por exemplo, pelo menos 2 vezes mais que a detecção de fundo). Com relação à ampliação de um polinucleotídeo alvo (por exemplo, por PCR), utilizando um par de *primer* de amplificação específico, "condições estridentes" são as condições que permitem o par de *primers* hibridizar ao polinucleotídeo alvo para o qual o *primer* tem a sequência correspondente do tipo selvagem. Condições estridentes são dependentes da sequência e serão modificadas em diferentes circunstâncias. Pelo controle da estridência da hibridização e/ou condições de lavagens, em que as sequências alvo podem

ser identificadas (sonda homóloga). Alternativamente, as condições de estringência podem ser ajustadas para permitir que algum emparelhamento inadequado nas sequências em graus menores de identidade seja detectado (sonda heteróloga). Geralmente, uma sonda é menor do que cerca de 1000 nucleotídeos de comprimento, ou menor do que 500 nucleotídeos de comprimento.

[0088] Conforme utilizado no presente, uma sequência substancialmente idêntica ou complementar é um polinucleotídeo que hibridiza ao complemento da molécula de ácido nucleico para o qual está sendo comparado sob condições de alta estringência. Condições adequadas de estringência que promovam a hibridização do DNA, por exemplo, 6X cloreto de sódio / citrato de sódio (SSC) a cerca de 45 °C, seguida por uma lavagem de SSC 2 a 50°C, são conhecidas pelos técnicos hábeis no assunto ou podem ser encontradas no Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Normalmente, condições estringentes para a hibridização e detecção serão aquelas na quais a concentração de sal é inferior a cerca de 1,5 M de íon de Na, tipicamente a uma concentração entre 0,01 a 1,0 M de íons de Na (ou outros sais) em pH 7,0 a 8,3 e a temperatura de pelo menos cerca de 30°C para sondas curtas (por exemplo, 10 a 50 nucleotídeos) e pelo menos cerca de 60°C para sondas longas (por exemplo, maiores que 50 nucleotídeos). Condições estringentes também podem ser alcançadas com a adição de agentes desestabilizadores, como a formamida. Exemplos de condições de baixa estringência incluem a hibridização com uma solução-tampão de 30 a 35% de formamida, NaCl 1 M, SDS 1% (dodecil sulfato de sódio) e a 37°C, e uma lavagem em SSC 1 a 2 (20X SSC = 3,0 M de NaCl / 0,3 M de citrato trissódico) entre 50 e 55°C. Exemplos de condições de estringência moderada incluem a hibridização em 40 a 45% de formamida, NaCl 1,0 M, SDS 1% e a 37°C, e uma lavagem em SSC 0,5 a 1 entre 55 e

60°C. Exemplos de condições de alta estringência inclui a hibridização em formamida 50%, NaCl 1 M, SDS 1% e a 37°C, e uma lavagem em SSC 0,1 entre 60 e 65°C. Opcionalmente, tampões de lavagem podem compreender cerca de 0,1% a cerca de 1% de SDS. A duração da hibridização é geralmente menor do que cerca de 24 horas, normalmente entre cerca de 4 a 24 horas. A duração de tempo de lavagem será de pelo menos um período de tempo suficiente para de atingir o equilíbrio.

[0089] Nas reações de hibridização, a especificidade é normalmente a função das lavagens pós-hibridização, sendo os fatores críticos; a força iônica e a temperatura final da solução de lavagem. Para híbridos DNA-DNA, a T_m pode ser aproximada a partir da equação de Meinkoth e Wahl, *Anal.Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\%forma) - 500/L$, onde M é a molaridade dos cátions monovalentes, %GC é o percentual de nucleotídeos guanossina e citosina no DNA, %forma, é a percentagem de formamida na solução de hibridização, e L é o comprimento do híbrido em pares de base. A T_m é a temperatura (sob a força iônica e pH definida) em que 50% de uma sequência alvo complementar hibridiza perfeitamente com uma sonda. A T_m é reduzida em cerca de 1°C para cada 1% de pareamento inadequado; assim, T_m , hibridização e/ou condições de lavagem podem ser ajustadas para hibridizar sequências de identidade pretendida. Por exemplo, se são procuradas sequências com identidade > 90%, a T_m pode ser diminuído em 10°C. Geralmente, condições estringentes são selecionadas para estarem em cerca de 5°C mais baixo do que o ponto de fusão térmico (T_m) para a sequência específica e seu complementar na força iônica e pH definidos. No entanto, muitas condições estringentes podem utilizar uma temperatura de hibridização e ou lavagem com 1, 2, 3 ou 4°C mais baixo do que o ponto de fusão térmico (T_m); condições de estringência moderada podem utilizar uma temperatura de hibridização e/ou lavagem de cerca de 6, 7,

8, 9, ou 10°C inferior ao ponto de fusão térmico (T_m), condições de baixa estringência podem utilizar uma temperatura de hibridização e/ou lavagem de cerca de 11, 12, 13, 14, 15 ou 20°C mais baixa do que o ponto de fusão térmico (T_m). Utilizando a equação, composições de hibridização e lavagem, e a T_m desejada, os técnicos do assunto irão entender que as variações na estringência da hibridização e/ou soluções de lavagem são inerentemente descritas. Se o grau de inadequações desejado resultou em uma T_m inferior a 45°C (solução aquosa) ou 32°C (solução de formamida) é ideal aumentar a concentração do SSC, para que uma temperatura mais elevada seja utilizada. Um guia abrangente para a hibridização de ácidos nucleicos é encontrado em Tijssen (1993) "*Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*", Parte I, (Elsevier, Nova Iorque); e Ausubel *et al.*, (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2 (Greene Publishing e Wiley-Interscience, Nova Iorque). Vide, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nova Iorque) e Haymes *et al.* (1985) em: "*Nucleic Acid Hybridization, a Practical Approach*", IRL Press, Washington.

[0090] Um polinucleotídeo é mencionado com sendo "complemento" de outro polinucleotídeo se eles apresentam complementaridade. Conforme é utilizado no presente, moléculas que referidas como exibindo "complementaridade completa", quando todos os nucleotídeos de uma das moléculas de polinucleotídeo são complementares a um nucleotídeo de outra. Duas moléculas são mencionadas como sendo "minimamente complementares" se elas podem hibridizar com outra molécula com estabilidade suficiente para permitir que estas permaneçam aneladas uma a outra, pelo menos, sob condições convencionais "de baixa estringência". De maneira semelhante, as moléculas são mencionadas como sendo "complementares" se elas podem hibridizar com outra molécula com

estabilidade suficiente para permitir que estas permaneçam aneladas uma a outra sob, pelo menos, condições convencionais de “alta estringência”.

[0091] São fornecidos métodos adicionais para a detecção da presença do DNA correspondente ao do evento DP-305423-1 em uma amostra. Em um exemplo de realização, o método compreende em (a) contatar a amostra biológica a uma sonda de polinucleotídeo que hibridiza sob condições estringentes de hibridização com o DNA da soja evento DP-305423-1 e, detectar especificamente o evento a DP-305423-1, (b) submeter à amostra e a sonda a condições estringentes de hibridização, e (c) detectar a hibridização da sonda ao DNA, em que a detecção da hibridização indica a presença do evento DP-305423-1.

[0092] Vários métodos podem ser utilizados para detectar a região específica DP-305423-1 ou fragmento amplificado desta, incluindo, mas não se limitando a, *Genetic Bit Analysis* (Nikiforov *et al.* (1994) *Nucleic Acid Res.* 22: 4167-4175) onde um oligonucleótido DNA é desenvolvido de modo que se sobrepõe tanto sobre as sequências de DNA flaqueante adjacentes quanto sobre a sequência de DNA inserido. O oligonucleotídeo é imobilizado em poços de uma placa de micro poços. Seguida pela PCR da região de interesse (utilizando um *primer* na sequência inserida e um na sequência de flaqueamento adjacente) um produto de PCR de fita simples pode ser hibridizado a um oligonucleotídeo imobilizado e servir como um molde para uma reação de extensão de uma única base única base utilizando uma DNA polimerase e ddNTPs específicos marcados para a próxima base esperada. A leitura pode ser baseada na fluorescência ou ELISA. Um sinal indica a presença da sequência inserida/flaqueamento, devido ao sucesso na amplificação, hibridização e extensão de única base.

[0093] Outro método de detecção é a técnica de pirosequenciamento com descrito por Winge ((2000) *Innov. Pharma. Tech.* 00:

18-24). Neste método, um oligonucleotídeo é projetado que se sobrepõem a junção do DNA adjacente e DNA inserido. O oligonucleotídeo é hibridizado com um produto de PCR de fita simples proveniente da região de interesse (um *primer* na sequência inserida e um na sequência de flanqueamento) e incubado na presença de uma DNA polimerase, ATP, sulfúrilase, luciferase, apirase, adenosina 5' fosfosulfato e luciferina. Os dNTPs são adicionados individualmente e a incorporação dos resultados em um sinal de luz é mensurada. Um sinal de luz indica a presença da sequência do transgene de inserção / flanqueamento, devido ao sucesso da amplificação, hibridização e extensão de base única ou multi base.

[0094] A fluorescência polarizada, como descrito por Chen *et al.* ((1999) *Genome Res.* 9: 492-498, 1999) é também um método que pode ser usado para detectar um fragmento amplificado da presente invenção. Usando este método, um oligonucleótido é projetado, de modo que se sobrepõe a junção do DNA de inserção e DNA de flanqueamento. O oligonucleotídeo é hibridizado com um produto de PCR de fita simples proveniente da região de interesse (um *primer* na sequência de DNA de inserção e um na sequência de DNA flanqueamento) e incubado na presença de uma DNA polimerase e ddNTPs marcadas com fluorescência. Extensões de base única resultam na incorporação dos ddNTP. A incorporação pode ser mensurada como uma mudança na polarização usando uma fluorímetro. Uma mudança na polarização indica a presença da sequência do transgene de inserção / flanqueamento, devido ao sucesso da amplificação, hibridização e extensão de base única ou multi base.

[0095] O Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) é descrito como um método para detectar e quantificar a presença de uma sequência de DNA e é totalmente compreendida nas instruções fornecidas pelo fabricante. Resumidamente, uma sonda de oligonucleotídeo

FRET é projetada, de modo que se sobrepõe a junção do DNA de inserção e DNA de flaqueamento. A sonda FRET e os primers de PCR (um primer na sequência de inserção e um primer na sequência genômica de flaqueamento) são cicladas na presença de uma polimerase termostável e dNTPs. Hibridização da sonda FRET resultada na clivagem e liberação da fração fluorescente afastando a fração de apagamento na sonda FRET. Um sinal fluorescente indica a presença da sequência do transgene de inserção / flaqueamento, devido ao sucesso da amplificação, hibridização.

[0096] Molecular Beacons foram descritos para o uso na detecção da sequência, tal como descrito por Tyangi ((1996) *Nature Biotech.* 14: 303-308). Resumidamente, uma sonda de oligonucleotídeo FRET é projetada, de modo que se sobrepõe a junção do DNA de inserção e DNA de flaqueamento. A única estrutura da sonda FRET resulta em seu conteúdo da estrutura secundária que mantém as moléculas de apagamento da fluorescência em estreita proximidade. A sonda FRET e os primers de PCR (um primer na sequência de inserção e um primer na sequência de flaqueamento) são cicladas na presença de uma polimerase termostável e dNTPs. Após a bem sucedida amplificação por PCR, hibridização da sonda FRET à sequência alvo resulta na remoção da estrutura secundária da sonda e separação espacial das moléculas fluorescentes e de apagamento. Resultando em um sinal fluorescente. Um sinal fluorescente indica a presença da sequência do transgene de inserção / flaqueamento, devido ao sucesso da amplificação, hibridização.

[0097] A reação de hibridização utilizando uma sonda específica para uma sequência encontrada dentro do fragmento amplificado é ainda outro método utilizado para se detectar o fragmento amplificado produzida por uma reação de PCR.

[0098] Conforme utilizado no presente, "kit" refere-se a um conjunto de reagentes para a realização de exemplos de realizações dos métodos da presente invenção, mais especificamente, a identificação e/ou a detecção do evento DP-305423-1 em amostras biológicas. O kit da presente invenção pode ser utilizado, e seus componentes podem ser especificamente ajustados, para fins de controle de qualidade (por exemplo, pureza dos lotes de sementes), a detecção dos eventos DP-305423-1 em material vegetal, ou material composto ou derivado de material vegetal como, por exemplo, mas não se limitando a produtos para a alimentação humana ou animal.

[0099] Em exemplos de realização específicos, é fornecido um kit para a identificação do evento DP-305423-1 em uma amostra biológica. O kit inclui um primeiro e um segundo *primer*, onde o primeiro e segundo *primers* amplificam uma polinucleotídeo compreendendo uma região específica do DP-305.423-1. Em um exemplo de realização adicional, o kit inclui ainda um polinucleotídeo para a detecção da região específica do DP-305423-1. O kit pode compreender, por exemplo, um primeiro *primer* que compreende um fragmento de um polinucleotídeo de SEQ ID NOs: 5, 6, 7 ou 82, em que o primeiro ou o segundo *primer* compartilha uma homologia ou complementaridade de sequência suficiente para o polinucleotídeo amplificar a região específica DP-305423-1. Por exemplo, em exemplos de realização específicos, o primeiro *primer* compreende um fragmento de um polinucleotídeo de SEQ ID NOs: 5, 6, 7 ou 82, em que o primeiro ou o segundo *primer* compartilha uma homologia ou complementaridade de sequência suficiente com o polinucleotídeo para amplificar a mencionada região específica DP-305423-1. O par *primer* pode compreender um primeiro *primer* que inclui um fragmento de uma região genômica 5' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, e um segundo *primer* que compreende um fragmento de uma região genômica 3' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, ou uma região de inserção de SEQ

ID NO: 5, 6, 7 ou 82 ou, alternativamente, o par de *primer* que compreende um fragmento de uma região genômica 3' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, e um segundo *primer* que compreende um fragmento de uma região genômica 5' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, ou uma região de inserção de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82. Em exemplos de realizações adicionais, o primeiro e o segundo *primer* pode incluir qualquer um ou qualquer combinação das sequências estabelecidas na SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 93 ou 94. Os *primers* podem ser de qualquer comprimento desde que suficiente para amplificar a região DP-305423-1, incluindo, por exemplo, pelo menos, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 15 ou 30 ou cerca de 7-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 nucleotídeos ou mais.

[00100] São ainda fornecidos kits para a detecção de DNA compreendendo pelo menos um polinucleotídeo que pode detectar a região específica DP-305423-1, em que o mencionado polinucleotídeo inclui pelo menos uma molécula de DNA de um comprimento suficiente de nucleotídeos homólogos contíguos ou complementares com as SEQ ID NOs: 5, 6, 7 ou 82. Em exemplos de realização específicos, o kit de detecção do DNA inclui um polinucleotídeo com a SEQ ID NO: 8, 9, 14, 15, 20, 21, 83 ou 84, ou inclui uma sequência que hibridiza com pelo menos uma sequência selecionada a partir do grupo constituído por: a) as sequências da região genômica 5' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, e as sequências da região de inserção de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82; e, b) as sequências de uma região 3' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, e as sequências da região de inserção de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82.

[00101] Qualquer um dos polinucleotídeos e fragmentos e variantes destes, empregados nos métodos e composições da presente invenção podem compartilhar uma identidade na sequência de uma região do

transgene inserido do evento DP-305423-1, uma sequência de junção do evento DP-305423-1 ou uma sequência de flanqueamento do evento DP-305423-1. Métodos para determinar a relação de várias sequências são conhecidos. Conforme utilizado no presente, o termo "sequência de referência" é uma sequência definida usada como uma base para a sequência de comparação. Uma sequência de referência pode ser um subconjunto ou a totalidade de uma determinada sequência, por exemplo, como um segmento de um cDNA de comprimento total ou sequência gênica, ou o cDNA ou sequência gênica completa. Conforme utilizado no presente, "janela comparação" refere-se a um segmento contíguo e especificado de uma sequência polinucleotídica, onde a sequência polinucleotídica na janela de comparação pode incluir adições ou deleções (ou seja, as lacunas) quando comparado com a sequência de referência (que não inclui adições e deleções) para otimizar o alinhamento dos dois polinucleotídeos. Geralmente, a janela de comparação é de pelo menos 20 nucleotídeos contíguos no comprimento e opcionalmente pode ser de 30, 40, 50, 100 ou maior. Os técnicos hábeis no assunto compreenderão que para evitar uma alta similaridade com uma sequência de referência, devido à inclusão de lacunas (*gap*) na sequência de polinucleotídeo um *gap* de penalidade normalmente é introduzida e é subtraída a partir do número de comparáveis.

[00102] Métodos para o alinhamento das sequências para a comparação são bem conhecidos no estado da técnica. Assim, a determinação da percentagem de identidade de sequência entre as duas sequências podem ser realizada utilizando um algoritmo matemático. Exemplos não limitantes de tais algoritmos matemáticos são o algoritmo de Myers e Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17; o algoritmo de alinhamento local de Smith *et al.* (1981)/*Adv. Appl. Math.* 2:482; o algoritmo de alinhamento global de Needleman Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; o método de alinhamento por procura de locais de

Pearson e Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 85:2444-2448; o algoritmo de Karlin e Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 87:2264, modificado como em Karlin e Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:5873-5877.

[00103] Implementações de computadores para estes algoritmos matemáticos podem ser utilizados para a comparação de sequências de determinar a identidade de sequência. Tais implementações incluem mais não estão limitadas a: CLUSTAL no programa PC/Gene (disponível pela *Intelligenetics, Mountain View, Califórnia*); o programa ALIGN (versão 2.0) e GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA e TFASTA no *GCG Wisconsin Genetics Software Package*, Versão 10 (disponível pela Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, Califórnia, EUA.). Alinhamentos usando estes programas podem ser realizados utilizando parâmetros padrões. O programa CLUSTAL está bem descrito por Higgins *et al.* (1988) *Gene* 73:237-244 (1988); Higgins *et al.* (1989) *CABIOS* 5:151-153; Corpet *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang *et al.* (1992) *CABIOS* 8:155-65; e Pearson *et al.* (1994) *Meth. Mol. Biol.* 24:307-331. O programa ALIGN é baseado no algoritmo de Myers and Miller (1988) *supra*. Uma tabela de resíduo pesado PAM120, uma penalidade de lacuna de 12, e uma lacuna de penalidade de 4 podem ser utilizadas com o programa ALIGN quando comparando as sequências de aminoácidos. Os programas BLAST de Altschul *et al* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403 são baseados nos algoritmos de Karlin e Altschul (1990) *supra*. A pesquisa de nucleotídeos BLAST pode ser realizada com o programa BLAST, *escore* = 100, *wordlength* = 12, para se obter sequências nucleotídicas homólogas para uma sequência nucleotídica que codifica uma proteína da invenção. A pesquisa de proteínas BLAST pode ser realizada com o programa BLASTX, *escore* = 50, *wordlength* = 3, para se obter sequências de aminoácidos homólogas para uma proteína ou polipeptídeo da invenção Para obter alinhamentos de lacunas para fins de comparação, O *gapped BLAST* (em

BLAST 2.0) pode ser utilizado tal como descrito em Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Alternativamente, PSI-BLAST (em BLAST 2.0) pode ser utilizada para executar uma pesquisa iterada que detecta relações distantes entre as moléculas. Vide, Altschul *et al.* (1997) *supra*. Quando se utiliza BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST, podem ser utilizados os parâmetros padrões dos respectivos programas (por exemplo, BLASTN para as sequências nucleotídicas, BLASTX para as sequências de proteínas). Vide "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>". O alinhamento também pode ser realizado manualmente, pela inspeção.

[00104] Os alinhamentos da sequência e os cálculos da percentagem de identidade podem ser determinados através de uma diversidade de métodos de comparação para a detecção de sequências homólogas, incluindo, mas não se limitando a, o Megalign®, programa da LASERGENE® bioinformática computação (DNASTAR® Inc., Madison, WI). Por exemplo, o alinhamento múltiplo das sequências aqui fornecidas pode ser realizado utilizando o método de alinhamento Clustal V (Higgins e Sharp (1989) *CABIOS*. 5:151-153) com os parâmetros padrão (GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=10). Os parâmetros predefinidos para os alinhamentos em pares e cálculo da percentagem de identidade das sequências proteicas utilizando o método Clustal V: KTUPLE=1, GAP PENALTY=3, WINDOW=5 e DIAGONALS SAVED=5. Para ácidos nucleicos estes parâmetros são KTUPLE=2, GAP PENALTY=5, WINDOW=4 e DIAGONALS SAVED=4. Após o alinhamento das sequências, utilizando o programa Clustal V, é possível obter uma "percentagem de identidade" e "divergências", visualizando a tabela "distâncias das sequência" no mesmo programa.

[00105] Salvo quando indicado em contrário, os valores de identidade de sequência/semelhança fornecidos no presente referem-se ao valor obtido utilizando GAP Versão 10 utilizando os seguintes parâmetros:% de

identidade e % de semelhança de uma sequência nucleotídica utilizando GAP peso 50 e Comprimento peso 3, e escore matriz o nwsgapdna.cmp% de identidade e % de semelhança de aminoácido usando GAP peso 8 de comprimento peso 2, e o escore matriz BLOSUM62, ou qualquer programa equivalente. Por "programa equivalente" refere-se a qualquer programa de comparação de sequência que, para quaisquer duas sequências em questão, gera um alinhamento idêntico dos nucleotídeos ou resíduo de aminoácido e uma percentagem idêntica na identidade da sequência, quando a comparação com o alinhamento correspondente gerado pelo GAP Versão 10 é pretendido.

[00106] GAP utiliza o algoritmo de Needleman e Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453, para encontrar o alinhamento de duas sequências completas que maximiza a verificação das repetições ou igualdade e minimiza o número de lacunas. O GAP considera todos os alinhamentos e posições gap possíveis e cria o alinhamento com o maior número de bases correspondentes menos gaps. Isto permite o fornecimento de uma penalidade de criação de gap e penalidade de extensão de gap em unidades de bases correspondentes. GAP deve dar uma vantagem na criação de penalidades do número de gap correspondente para cada gap inserido. Se uma penalidade da extensão de gap maior que zero é escolhida, GAP deve, além disso, fazer um lucro para cada lacuna inserido do comprimento do fosso vezes o fosso extensão pena. Predefinição fosso criação penas valores e desnível extensão pena valores na Versão 10 do GCG Wisconsin Genética pacote de software para sequências proteicas são 8 e 2, respectivamente. Para o padrão sequências nucleotídicas fosso criação pena é de 50, enquanto o padrão diferencial extensão pena é de 3. As penalidades de gap de criação e gap de extensão podem ser expressas como um inteiro selecionado a partir do grupo de inteiros constituídos de 0-200. Assim, por exemplo, as penalidades de gap

de criação e gap de extensão podem ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ou superior.

[00107] O GAP apresenta um membro da família de alinhamentos melhores. Pode haver muitos membros desta família, mas nenhum outro membro possui uma qualidade melhor. O GAP mostra quatro figuras de mérito para os alinhamentos: Qualidade, Relação, Identidade e Semelhança. A qualidade é a métrica maximizada, a fim de alinhar as sequências. Relação é a qualidade dividida pelo número de bases no menor segmento. Percentual de Identidade é a porcentagem dos símbolos que são efetivamente correspondentes. Percentual de Semelhança é a porcentagem dos símbolos que são semelhantes. Símbolos que estão em frente à gaps são ignorados. A semelhança é pontuada quando o valor da escore matriz para um par de símbolos for superior ou igual a 0,50, ao limiar de semelhança. O escore matriz utilizada na versão 10 do GCG *Wisconsin Genetics Software Package* foi BLOSUM62 (vide, Henikoff e Henikoff (1989) *Proc. Natl.. Acad. USA.* 89:10915).

[00108] Conforme utilizado no presente, "identidade de sequência" ou "identidade" no contexto de duas sequências de polinucleotídeos faz referência aos resíduos nas duas sequências que são os mesmos quando alinhados para o máximo de correspondência, ao longo de uma janela de comparação determinada. Quando a porcentagem de identidade da sequência é usada em referência às proteínas, é reconhecido que as posições de resíduo que não são idênticos diferem muitas vezes por substituições conservadoras de aminoácido, onde os resíduos de aminoácidos são substituídos por outros resíduos de aminoácidos com propriedades químicas semelhantes (por exemplo, carga ou hidrofobicidade) e, por conseguinte, não modificam as propriedades funcionais da molécula. Quando sequências diferem nas substituições conservadoras, o percentual de identidade na sequência pode ser ajustado para cima para corrigir a natureza conservadora da substituição.

Sequências que diferem por essas substituições conservadoras são mencionadas com possuindo "semelhança na sequência" ou "similaridade". Métodos para realizar essa adaptação são bem conhecidos pelos técnicos hábeis no assunto. Normalmente isto envolve o ganho de uma substituição conservadora como uma substituição parcial ao invés de uma combinação mal sucedida completa, aumentando assim a percentagem na identidade de sequência. Assim, por exemplo, onde há um aminoácido idêntico é atribuída uma pontuação de 1 e uma substituição não-conservadora é atribuída uma pontuação de zero, uma substituição conservador é atribuída uma pontuação entre zero e 1. A pontuação das substituições conservadoras é calculada, por exemplo, como implementado no programa PC/Gene (*Intelligenetics, Mountain View, Califórnia*).

[00109] Conforme utilizado no presente, "percentagem de identidade na sequência", significa o valor determinado pela comparação duas sequências otimamente alinhadas ao longo de uma janela de comparação, onde partes das sequências polinucleotídicas na janela de comparação podem incluir adições e deleções (ou seja, as gaps), em comparação com o sequência de referência (que não incluem adições e deleções) para otimizar o alinhamento das duas sequências. A porcentagem é calculada pela determinação do número de posições em que a mesma base de ácido nucleico ou de resíduos de aminoácido ocorre em ambas as sequências para produzir o número de posições combinadas, dividindo o número de posições combinadas pelo número total de posições na janela de comparação, e multiplicando o resultado por 100 para dar a percentagem de identidade das sequências.

[00110] A presente invenção fornece métodos para controlar ervas daninhas em uma área de cultivo, a impedir o desenvolvimento ou o aparecimento de ervas daninhas resistentes à herbicidas em uma área de cultivo, produzindo uma cultura, e aumentando a segurança da cultura. A

expressão "controlar", e suas derivações, por exemplo, como em "controlar ervas daninhas" refere-se a uma ou mais ações de inibir o crescimento, germinação, reprodução e/ou a proliferação e/ou matar, remover, destruir ou diminuir a ocorrência e/ou atividade de uma erva daninha.

[00111] Conforme utilizado no presente, uma "área de cultivo" compreende qualquer região no qual se deseja cultivar uma planta. Essas áreas de cultivos incluem, mas não são limitados a um campo no qual a planta é cultivada (como um campo de cultivo, um campo relvado, um campo com árvores, uma floresta gerida, um campo de cultivo de frutos e legumes, etc), uma estufa, uma câmara de crescimento, etc.

[00112] Os métodos da presente invenção compreendem o plantio da área de cultivo da soja com sementes ou plantas DP-305423-1, e em exemplos de realização específicos, administrando ao cultivo, sementes, ervas daninhas ou da área de cultivo uma quantidade efetiva de um herbicida de interesse. É reconhecido que o herbicida pode ser aplicado antes ou depois da colheita na área de cultivo. Tal administração de herbicida pode incluir a administração de um inibidor de ALS. Em determinados exemplos de realização, um inibidor de ALS é aplicado à soja evento DP-305423-1, em que a concentração efetiva de inibidores de ALS iria prejudicar significativamente um adequado controle de plantas. Em um exemplo de realização não-limitante, o herbicida compreende pelo menos um de um sulfonilaminocarboniltriazolinona; um triazolopirimidina; um benzoato (tio) pirimidinil; uma imidazolinona; um triazina, e/ou um ácido fosfínico.

[00113] Outro exemplo de realização não limitante, compreende o herbicida imazapir, clorimuronetílico, quizalofop, orfomesafen, onde uma quantidade efetiva é tolerada pela cultura e controla ervas daninhas. Tal como divulgado em outros locais no presente, qualquer quantidade efetiva desses herbicidas pode ser aplicado. Em determinados exemplos de

realização, uma quantidade de imazapir compreendendo cerca de 7,5 a 27,5 g ai/ha; uma quantidade efetiva de clorimuronetílico compreendendo cerca de 7,5 a 27,5 g ai/ha; uma quantidade efetiva de quizalofop compreendendo cerca de 50 a 70 g ai/ha, e um quantidade efetiva de fomesafen compreendendo cerca de 240 a 260 g ai/ha.

[00114] Em outros exemplos de realização, é aplicado uma combinação de pelo menos dois herbicidas. Mais detalhes sobre as várias combinações de herbicidas que podem ser empregados nos métodos da presente invenção são discutidos em outra seção no presente.

[00115] O "controle" ou "controle vegetal" ou "controle de células vegetais" fornece um ponto de referência para medir as variações no fenótipo da planta ou células vegetais, e pode ser de qualquer planta ou célula vegetal adequada. Um controle de plantas ou células vegetais pode incluir, por exemplo: (a) um vegetal ou célula vegetal do tipo selvagem, ou seja, do mesmo genótipo como a matéria-prima utilizada para a alteração genética que resultou no assunto ou célula vegetal, (b) um vegetal ou de células vegetais de mesmo genótipo como o da matéria-prima, mas que foi transformado com uma construção nulo (ou seja, com uma construção que não tem efeitos conhecidos sobre a característica de interesse, tais como uma construção contendo um gene marcador), (c) um vegetal ou célula vegetal que é um segregante não transformado entre a progênie de um vegetal ou células vegetais de plantas; (d), um vegetal ou células vegetais, que são geneticamente idênticas ao vegetal ou célula vegetal em questão, mas que não é exposta ao mesmo tratamento (por exemplo, tratamento herbicida), como as plantas ou células vegetais em questão, (e) a matéria vegetal ou célula vegetal desta, em condições em que o gene de interesse não é expresso, ou (f) a matéria vegetal ou as células vegetais desta, em condições que não tenham sido expostas a um tratamento especial, como, por exemplo, um herbicida ou uma combinação

de herbicidas e/ou outros produtos químicos. Em alguns casos, um controle adequado de plantas ou de células vegetais que podem ter um genótipo diferente a partir da planta ou células vegetais em questão, mas pode partilhar as características de sensibilidade ao herbicida das matérias-primas para a(s) alteração(ões) genética(s) que resultou no vegetal ou célula vegetal em questão (vide, por exemplo, Green (1998) *Weed Technology* 12: 474-477; Green e Ulrich (1993) *Weed Science* 41: 508-516. Em alguns casos, um controle adequado de plantas de soja é um "Jack" de plantas de soja (*Illinois Foundation Seed*, Champaign, Illinois). Em outros exemplos de realização, os segregantes nulos podem ser usados como um controle, uma vez que são geneticamente idênticos ao DP-305423-1, com exceção dos transgênicos com inserção de DNA.

[00116] Qualquer herbicida pode ser aplicado ao cultivo da soja DP-305423-1, ou na área de cultivo contendo este vegetal cultivado. As classificações de herbicidas (ou seja, o agrupamento de herbicidas em classes e subclasses) são bem conhecidas no estado da técnica e inclui as classificações pelo HRAC (*Herbicide Resistance Action Committee*) e WSSA (*Weed Science Society of America*) (vide também, Retzinger e Mallory-Smith (1997) *Weed Technology* 11: 384-393). Uma versão abreviada da classificação HRAC (com notas relativas ao grupo WSSA correspondente) é apresentada abaixo na Tabela 2.

[00117] Os herbicidas podem ser classificados pelo seu modo de ação e/ou pelo local de ação e também podem ser classificados pelo tempo em que são aplicadas (por exemplo, pré-emergente ou pós-emergente), através do método de aplicação (por exemplo, aplicação foliar ou no solo), ou pela forma como são absorvidas ou como afetam as plantas. Por exemplo, tifensulfuronmetílico e tribenuronmetílico são aplicados à folhagem de uma cultura e geralmente são metabolizados lá, enquanto rimsulfuron e

clorimuronetílico geralmente são absorvidos tanto pelas raízes quanto pela folhagem de uma planta. "Modo de ação" geralmente se refere ao processo metabólico ou fisiológico no interior da planta que o herbicida inibe ou não prejudica, enquanto "local de ação" geralmente refere-se à localização física ou bioquímica dentro da planta onde o herbicida age ou interage diretamente. Herbicidas podem ser classificados de diversas formas, inclusive através do modo de ação e/ou do local de ação (vide, por exemplo, Tabela 2).

[00118] Muitas vezes, um gene de tolerância a herbicida que confere tolerância a um determinado herbicida ou outros produtos químicos em um vegetal ao ser expresso confere também uma tolerância a herbicidas ou outros produtos químicos na mesma classe ou subclasse, por exemplo, uma classe ou subclasse estabelecidos na Tabela 2. Assim, em alguns exemplos de realização da presente invenção, uma planta transgênica da presente invenção é tolerante a mais de um herbicida ou químico na mesma classe ou subclasse, como, por exemplo, um inibidor da OPP, uma sulfonilureia, ou auxinas sintéticas.

[00119] A invenção fornece uma planta de soja transgênica, que pode ser selecionada para uso na produção agrícola baseada na prevalência de espécies de ervas daninhas tolerantes aos herbicidas na área onde o cultivo transgênico deve ser cultivado. Métodos são conhecidos no estado da técnica para a avaliação da tolerância ao herbicida de várias espécies de ervas daninhas. Técnicas de gestão de ervas daninhas, são também conhecidas no estado da técnica, como, por exemplo, rotação de culturas utilizando uma cultura que é tolerante a um herbicida para o qual as ervas daninhas local não são tolerantes. Uma série de entidades de monitoramento e reportam a incidência e as características das ervas daninhas tolerantes a herbicidas, incluindo o *Herbicide Resistance Action Committee* (HRAC), o *Weed Science Society of America*, e várias agências estatais (vide, por exemplo, *herbicide*

tolerance scores for various broadleaf weeds from the 2004 Illinois Agricultural Pest Management Handbook), e um técnico hábil no assunto seria capaz de usar esta informação para determinar quais as culturas e combinações de herbicidas devem ser utilizadas em um determinado local.

[00120] Estas entidades também publicam conselhos e orientações para prevenir o desenvolvimento e/ou aparecimento de ou controle da disseminação de ervas daninhas tolerantes a herbicidas (vide, por exemplo, Owen and Hartzler (2004), *2005 Herbicide Manual for Agricultural Professionals*, Pub. WC 92 revisado (Iowa State University Extension, Iowa State University of Science and Technology, Ames, Iowa); *Weed Control for Corn, Soybeans, and Sorghum*, Capítulo 2 do "2004 Illinois Agricultural Pest Management Handbook" (University of Illinois Extension, University of Illinois, Illinois); *Weed Control Guide for Field Crops*, MSU Extension Bulletin E434 (Michigan State University, Michigan)).

TABELA 2

VERSÃO ABREVIADA DA CLASSIFICAÇÃO DE HERBICIDAS HRAC

I. INIBIDORES DE ALS (GRUPO 2 WSSA1)

A. Sulfonilureas	
1. Azimsulfuron	17. Flupirsulfuron-metilico
2. Clorimuronetilico	18. Foramsulfuron
3. Metsulfuronmetilico	19. Imazosulfuron
4. Nicosulfuron	20. Iodosulfuronmetilico
5. Rimsulfuron	21. Mesosulfuronmetilico
6. Sulfometuronmetilico	22. Oxasulfuron
7. Tifensulfuron-metilico	23. Primisulfuron-metilico
8. Tribenuron-metilico	24. Prosulfuron
9. Amidosulfuron	25. Pirazosulfuron-metilico

10. Bensulfuron-metilico	26. Sulfosulfuron
11. Clorsulfuron	27. Triasulfuron
12. Cinosulfuron	28. Triflóisulfuron
13. Ciclosulfamuron	29. Triflusulfuron-metilico
14. Etametsulfuron-metilico	30. Tritosulfuron
15. Etóisulfuron	31. Halosulfuron-metilico
16. Flazasulfuron	32. Flucetosulfuron
B. Sulfonilaminocarboniltriazolinonas	
1. Flucarbazona	2. Procarbazona
C. Triazolopirimidinas	
1. Cloransulam-metilico	5. Metosulam
2. Flumetsulam	6. Penoxsulam
3. Diclosulam	7. Piroxsulam
4. Florasulam	
D. Pirimidiniloxi(tio)benzoatos	
1. Bispiribac	4. Piritiobac
2. Piriftalida	5. Piriminobac-metilico
3. Piribenzoxim	
E. Imidazolinonas	
1. Imazapir	4. Imazapic
2. Imazethapir	5. Imazametabenz-metilico
3. Imazaquin	6. Imazamox

II. OUTROS HERBICIDAS – INGREDIENTES ATIVOS / MODOS DE AÇÃO ADICIONAIS

A. Inibidores da Acetil CoA carboxilase (ACCase) (Grupo 1 WSSA)
1. Ariloxifenoxipropionatos ('FOPs')

a. Quizalofop-P-etil	f. Propaquizafop
b. Diclofop-metil	g. Haloxifop-P-metil
c. Clodinafop-propargil	h. Cihalofof-butil
d. Fenoxaprop-P-etil	i. Quizalofop-P-etil
e. Fluazifop-P-butil	
2. Ciclohexanedionas ('DIMs')	
a. Alloxidim	e. Setoxidim
b. Butroxidim	f. Tepraloxidim
c. Cletodim	g. Tralkoxidim
d. Cicloxidim	
B. Inibidores da fotossíntese - fotossistema II Grupo C1 HRAC / Grupo 5 WSSA	
1. Triazinas	
a. Ametrina	h. Propazina
b. Atrazina	i. Simazina
c. Cianazina	j. Simetrina
d. Desmetrina	k. Terbumeton
e. Dimetametrina	l. Terbutilazina
f. Prometon	m. Terbutrina
g. Prometrina	n. Trietazina
2. Triazinonas	
a. Hexazinona	c. Metamitron
b. Metribuzin	
3. Triazolinona	
a. Amicarbazona	

4. Uracilas	
a. Bromacil	c. Terbacil
b. Lenacil	
5. Piridazinonas	
a. Pirazon	
6. Fenil carbamatos	
a. Desmedifam	b. Fenmedifam
C. Inibidores da fotossíntese no fotossistema II Grupo C2 HRAC / Grupo 7 WSSA	
1. Ureias	
a. Fluometuron	j. Isoproturon
b. Linuron	k. Isouron
c. Clorobromuron	l. Metabenzthiazuron
d. Clorotoluron	m. Metobromuron
e. Cloroxuron	n. Metoxuron
f. Dimefuron	o. Monolinuron
g. Diuron	p. Neburon
h. Etidimuron	q. Siduron
i. Fenuron	r. Tebutiuron
2. Amidas	
a. Propanil	b. Pentanoclor
D. Inibidores da fotossíntese no fotossistema II Grupo C3 HRAC / Grupo 6 WSSA	
1. Nitrilas	
a. Bromofenoxim	c. Ioxinil

b. Bromoxinil	
2. Benzotiadiazinona (Bentazona)	
a. Bentazona	
3. Fenilpiridazinas	
a. Piridato	b. Piridafol
E. Desvio de elétrons no fotossistema I (Bipiridílios) (Grupo 22 WSSA)	
1. Diquat	2. Paraquat
F. Inibidores da PPO (protoporfirinogênio oxidase) (Grupo 14 WSSA)	
1. Difenileteres	
a. Acifluorfen-Na	e. Fomesafen
b. Bifenox	f. Halosafen
c. Clometoxifen	g. Lactofen
d. Fluoroglicofen-etílico	h. Oxifluorfen
2. Fenilpirazoles	
a. Fluazolato	b. Piraflufeno-etílico
3. N-fenilftalimidas	
a. Cinidon-etílico	c. Flumiclorac-pentil
b. Flumioxazina	
4. Tiadiazolas	
a. Flutiacet-metil	b. Tiazimidin
5. Oxadiazolas	
a. Oxadiazon	b. Oxadiargil
6. Triazolinonas	
a. Carfentrazone-etílico	b. Sulfentrazone
7. Oxazolidinediones	

I.	Descoloração: Inibição da biossíntese de carotenóide (sítio de ação desconhecido) (Grupo 11 e 13 WSSA)
	1. Triazóis (Grupo 11 WSSA)
	a. Amitrola
	2. Isoxazolidinonas (Grupo 13 WSSA)
	a. Clomazona
	3. Ureias
	a. Fluometuron
	4. Difeniléteres
	a. Aclonifeno
J.	Inibição da EPSP sintase
	1. Glicinas (Grupo 9 WSSA)
	a. Glifosato b. Sulfosato
K.	Inibição da glutamina sintetase
	1. Ácido Fosfínico
	a. Glufosinato de amônio b. Bialafos
L.	Inibição da DHP dihidropteroato sintetase (Grupo 18 WSSA)
	1. Carbamatos
	a. Asulam
M.	Inibição da montagem de microtúbulos (Grupo 3 WSSA)
	1. Dinitroanilinas
	a. Benfluralina e. Orizalina
	b. Butralina f. Pendimetalina
	c. Dinitramina g. Trifluralina
	d. Etalfluralina

2. Fosforoamidatos
a. Amiprofos-metílico b. Butamifos
3. Piridinas
a. Ditiopir b. Tiazopir
4. Benzamidas
a. Pronamida b. Tebutam
5. Ácidos benzenodicarboxílicos
a. Clorotal-dimetil
N. Inibição da mitose / organização de microtúbulos (Grupo 23 WSSA)
1. Carbamatos
a. Cloroporfam c. Carbetamida
b. Porfam
O. Inibição da divisão celular (Inibição de muito ácidos graxos de cadeia muito longa como mecanismo proposto; Grupo 15 WSSA)
1. Cloroacetamidas
a. Acetoclora g. Metolaclo
b. Alaclora h. Petoxamida
c. Butaclora i. Pretilaclora
d. Dimetaclora j. Propaclora
e. Dimetanamida k. Propisoclo
f. Metazaclora l. Tenilclora
2. Acetamidas
a. Difenamida c. Naproanilida
b. Napropamida
3. Oxiacetamidas

a. Flufenacet	b. Mefenacet
4. Tetrazolinonas	
a. Fentrazamide	
5. Outros	
a. Anilofos	c. Indanofan
b. Cafenstrole	d. Piperofos
P. Inibição da síntese da parede celular (celulose) (grupo 20 WSSA)	
1. Nitrilas	
a. Diclobenil	b. clortiamida
2. Benzamidas (isoxabeno (Grupo 21 WSSA))	
a. Isoxabeno	
3. Triazolocarboxamida (flupoxam)	
a. Flupoxam	
Q. Desacopladores (ruptura de membranas) (Grupo 24 WSSA)	
1. Dinitrofenóis	
a. DNOC	c. Dinoterb
b. Dinoseb	
R. Inibição da síntese de lipídeos por outro modo que não a inibição do ACC	
1. Tiocarbamatos (Grupo 18 WSSA)	
a. Butilato	h. Pebulato
b. Cicloato	i. Prosulfocarb
c. Dimepiperato	j. Bentiocarb
d. EPTC	k. Tiocarbazil
e. Esprocarb	l. Triallato
f. Molinato	m. Vemolato

g. Orbencarb	
2. Fosforoditioatos	
a. Bensulida	
3. Benzofuranos	
a. Benfuresato	b. Etofumesato
4. Ácidos alcanóicos halogenados (Grupo 26 WSSA)	
a. TCA	c. Flupropanato
b. Dalapon	
S. Auxinas sintéticas (similares a ação do IAA) (Grupo 4 WSSA)	
1. Ácidos fenoxicarboxílicos	
a. Clomeprop	c. Mecoprop
b. 2,4-D	
2. Ácidos Benzóicos	
a. Dicamba	c. TBA
b. Clorambeno	
3. Ácidos carboxílicos pirimidinas	
a. Clopiralid	c. Picloram
b. Fluroxipir	d. Triciclopir
4. Ácidos carboxílicos quinolina	
a. Quinclorac	b. Quinmerac
5. Outros (benazolina-etil)	
a. Benazolina-etílico	
T. Inibição do Transporte da autaxina	
1. Ftalamatos; semicarbazonas (Grupo 19 WSSA)	

a. Naphtalam	b. Diflufenzopir-Na
U. Outros mecanismos de ação	
1. Ácidos arilaminopropionicos	
a. Flamprop-M-metil /-isopropil	
2. Pirazolio	
a. Difenzoquat	
3. Organoarsenicais	
a. DSMA	b. MSMA
4. Outros	
a. Bromobutida	h. Fosamina
b. Cinmetilin	i. Metam
c. Cumiluron	j. Oxaziclomefone
d. Dazomet	k. Oleic acid
e. Daimuron-metilico	l. Pelargonic acid
f. Dimuron	m. Piributicarb
g. Etobenzanida	

[00121] Em um exemplo de realização, um inibidor de ALS ou, pelo menos, dois inibidores de ALS são aplicados a soja evento DP-305423-1 ou área de cultivo desta. Os inibidores de ALS podem ser aplicados em qualquer taxa efetiva que controle seletivamente as ervas daninhas e não prejudiquem significativamente a cultura. Em exemplos de realização específicos, pelo menos um inibidor de ALS é aplicado em um nível que possa significativamente causar danos em um controle de planta adequada. Em outros exemplos de realização, pelo menos um inibidor de ALS é aplicado sob a taxa de uso recomendada no rótulo para a cultura. Em outros exemplos de

realização, uma mistura de inibidores de ALS é aplicada a uma taxa inferior à taxa de uso recomendada e as ervas daninhas continuam a ser controladas seletivamente. Herbicidas que inibem a acetolactato sintase (também conhecida como ácido acetohidroxi sintase) e, portanto, são úteis nos métodos da presente invenção incluem sulfonilureias como as listadas na Tabela 2, incluindo os sais agronomicamente adequados destes (por exemplo, sais de sódio); sulfonilaminocarboniltriazolinonas como as listadas na Tabela 2, incluindo os sais agronomicamente adequados destes (por exemplo, sais de sódio); triazolopirimidinas como as listadas na Tabela 2, incluindo os sais agronomicamente adequados destes (por exemplo, sais de sódio); pirimidiniloxi (tio) benzoatos como os listados na Tabela 2, incluindo seus sais agronomicamente adequados (por exemplo, sais de sódio), e imidazolinonas conforme listado na Tabela 2, incluindo seus sais agronomicamente adequados (por exemplo, sais de sódio). Em alguns exemplos de realização, os métodos da presente invenção incluem o uso de uma sulfonilureia, que não é clorimuron-etila, clorsulfuron, rimsulfuron, tifensulfuron-metila, ou tribenuron-metila.

[00122] Assim, em alguns exemplos de realização, uma planta transgênica da presente invenção é utilizada em um método de cultivo com uma soja PD-305423-1 por meio da aplicação de herbicidas ao qual a planta é tolerante. Desta forma, o tratamento com uma combinação de um ou mais herbicidas que incluem, mas não estão limitados a: acetoclor, acifluorfen e seu sal de sódio, aclonifen, acroleína (2-propenal), alaclor, alloxidim, ametrin, amicarbazona, amidosulfuron, aminopirralida, amitrol, sulfamato amônio, anilofos, asulam, atrazina, azimsulfuron, beflubutamida, benazolin, benazolin-etila, bencarbazona, benfluralin, benfuresato, bensulfuron-metila, bensulida, bentazona, benzobiciclon, benzofenap, bifenox, bilanafos, do bispiribac e seus sais de sódio, bromacil, bromobutida, bromofenoxim, bromoxinil, bromoxinil octanoato, butaclor, butafenacil, butamifos, butralin, butroxidim, butilato,

cafenstrole, carbetamida, carfentrazona-etil, catoquina, clometoxifeno, clorambeno, clorbromuron, clorflurenol-metila, cloridazon, clorimuron-etila, clortoluron, clorprofam, clorsulfuron, clortal-dimetil, clortiamida, cinidon-etila, cinmetilin, cinosulfuron, cletodim, clodinafope-propargil, clomazona, clomeprop, clopiralida, clopiralida-olamina, cloransulam-metila, CUH-35 (2-metoxietílico 2 - [[4-cloro-2-fluoro-5-[(1-metil-2-propinilo)oxi]-fenil](3-fluorobenzoil)-amino]carbonil]-1-cicloexeno-1-carboxilato), cumiluron, cianazina, cicloato, ciclosulfamuron, cicloxidim, cihalofope-butila, 2,4-D e seus ésteres butotil, butil, isooctil e isopropil e seus sais de dimetilamônio, diolamina trolamina e sais, daimuron, dalapon, dalapon-sódio, dazomet, 2,4-DB e seus sais de dimetilamônio, de potássio e de sódio, desmedifame, desmetrin, dicamba e seus sais de diglicolamônio, de dimetilamônio, de potássio e de sódio, desmedifam, desmetrim, dicamba e seus sais de diglicolamônio, de dimetilamônio, de potássio e de sódio, diclobenil, diclorprope, diclofop-metila, diclosulam, difenzoquat metilsulfato, diflufenican, diflufenzopir, dimefuron, dimepiperato, dimetaclor, dimetametrin, dimetenamida, dimetenamida-P, dimetipin, ácido dimetilarsênico e seu sal de sódio, dinitramino, dinoterbe, difenamida, dibrometo de diquato, ditiopir , diuron, DNOC, endotal, EPTC, esprocarb, etalfluralin, etametsulfuron-metila, etofumesato, etoxifen, etoxisulfuron, etobenzanid, fenoxaprop-etila, fenoxaprop-P-etila, fentrazamida, fenuron, fenuron-TCA, flamprop-metila, flamprop-M -isopropilo, flamprop-M-metila, flazassulfuron, florasulame, fluazifop-butyl, fluazifop-P-butilo, flucarbazona, flucetosulfuron, flucloralin, flufenacete, flufenpir, flufenpir-etila, Flumetsulame, flumiclorac-pentil, flumioxazin, fluometuron, fluoroglicofen-etila , flupirsulfuron-metila e seus sais de sódio, flurenol, flurenol-butyl, fluridona, flurocloridona, fluroxipir, flurtamona, flutiacet-metila, fomesafen, foramsulfuron, fosamino-amônio, glufosinato, glufosinato, glifosato e seus sais, tais como amônio, isopropilamônio , potássio, sódio (incluindo sesquisodium) e-trimésio

(alternativamente camado sulfosato), halosulfuron-metila, haloxifop-etotila, haloxifop-metila, hexazinona, HOK-201 (N-(2,4-difluorofenila) -1,5-dihidro-A/(1-metiletil)-5-oxo-1-[(tetrahidro-2/-piran-2-il)-metil]-4H-1,2,4-triazol-4-carboxamida), imazametabenzo-metila, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquin, imazaquin de amônio, imazetapir, imazetapir de amônio, imazossulfuron, indanofan, iodosulfuron-metila, ioxinil, ioxinil octanoato, ioxinil de sódio, isoproturon, isouron, isoxaben, isoxaflutol, isoxaclortole, lactofen, lenacil, linuron, hidrazida maleica, MCPA e seus sais (por exemplo, MCPA-dimetilamônio, MCPA-sódio e MCPA-potássio, ésteres (por exemplo, MCPA-2-etilhexil, MCPA-butoetil) e tioésteres (por exemplo, MCPA-tioetil), MCPB e seus sais (por exemplo, o MCPB de sódio) e ésteres (por exemplo, o MCPB-etil), mecoprope, mecoprope-P, mefenacet, mefluidida, mesossulfuron-metila, mesotriona, Metam-sódico, metamifop, metamitron, metazaclor, metabenzthiazuron, ácido metilarsênico e seus sais de cálcio, de monoamônico, monossódio dissódio e, metildimron, metobenzuron, metobromuron, metolaclor, S-metolaclor, metosulam, metoxuron, metribuzin, metsulfuron-metil, molinato, monolinuron, naproanilida, napropamida, naptalam, neburon, nicosulfuron, norflurazon, orbencarb, orizalin, oxadiargil, oxadiazon, oxasulfuron, oxaziclomefona, oxifluorfen, paraquat dicloreto, pebulato, ácido pelargônico, pendimetalina, penoxsulame, pentanoclor, pentoxazona, perfluidona, petoxiamid, fenemedifame, picloram, picloram-potássio, picolinafena, pinoxadene, piperofos, pretilaclor, primisulfuron-metila, prodiamino, profoxidime, prometon, prometrina, propaclor, propanil, propaquizafof, propazina, profame, propisocloro, propoxicarbazona, propizamida, prosulfocarb, prossulfuron, piraclonil, piraflufena-etila, pirasulfotole, pirazogil, pirazolinato, pirazoxifen, pirazosulfuron-etila, piribenzoxim, piributicarb, piridato, piriftalid, piriminobac-metila, pirimisulfan, piritiobac, piritiobac-sódio, piroxsulam, quinclorac, quinmerac, quinclamino, quizalofop-etila, quizalofop-P-etila,

quizalofop-p-tefuril, rimsulfuron, setoxidim, siduron, simazina, simetrin, sulcotriona, sulfentrazona, sulfometuron-metil, sulfossulfuron, 2,3,6-TBA, ACT, ACT-sódio, tebutam, tebutiuron, tefuriltriona, tembotriona, tepraloxidima, terbacil, terbumeton, terbutilazine, terbutrina, tenilcloro, tiazopir, tiencarbazona, tifensulfuron-metila, tiobencarb, tiocarbazil, topramezona, tralkoxidim, tri-allato, triassulfuron, triaziflam, tribenuron-metila, triclopir, triclopir-butotil, triclopir-trietilamônio, tridifano, trietazina, trifloxisulfuron, trifluralin, triflusulfuron-metila, tritosulfuron e vernolato são divulgados.

[00123] Outros herbicidas e agrotóxicos adequados são conhecidos no estado da técnica, como, por exemplo, os descritos no documento WO 2005/041654. Entre os outros herbicidas também estão incluídos os bioherbicidas, como *Alternaria destruens*; Simmons, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc, *Drechslera monoceras* (MTB-951), *Myrothecium verrucaria* (Albertini & Schweinitz) Ditmar: Fries, *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. e *Puccinia thlaspeos* Schub. Combinações de diferentes herbicidas podem resultar em um efeito mais que aditivo (ou seja, sinérgico) sobre ervas daninhas e/ou um efeito menos que aditivo (ou seja, protetor), em culturas ou outras plantas desejáveis.

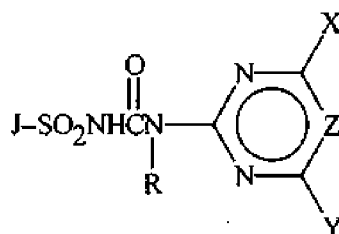
[00124] Quantidades efetivas para ação herbicida de um determinado herbicida pode ser facilmente determinado por um técnico hábil no assunto através da simples experimentação.

[00125] Herbicidas podem ser classificados em grupos e/ou subgrupos, como descrito acima com referência ao seu modo de ação, ou eles podem ser classificados em grupos e/ou subgrupos de acordo com sua estrutura química.

[00126] Herbicidas sulfonamidas têm como uma característica essencial de sua estrutura molecular, uma fração sulfonamida ($-S(=O)_2NH-$). Como referido no presente, herbicidas sulfonamida incluem especialmente

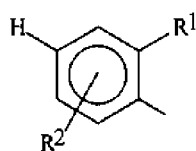
o herbicida sulfonilureia, herbicida sulfonilaminocarboniltriazolinona e herbicida triazolopirimidina. Em herbicida sulfonilureia um grupo sulfonamida é um componente em uma ponte de sulfonilureia ($-S(=O)_2NHC(=O)NH(R)-$). Em herbicidas sulfonilureia a extremidade sulfonil da ponte de sulfonilureia é ligada tanto diretamente quanto por meio de um átomo de oxigênio ou o grupo amino ou metileno é opcionalmente substituído por um grupo cíclico ou acíclico. Na extremidade oposta da ponte sulfonilureia, o grupo amino, que pode ter um substituinte, tal como metil (sendo R: CH_3) em vez de hidrogênio, está ligado a um grupo heterocíclico, tipicamente uma pirimidina simétrica ou anel triazina, tendo um ou dois substituintes tais como metil, etil, trifluormetil, metoxi, etoxi, metilamino, dimetilamino, etilamino e os halógenos. Em um herbicida sulfonilaminocarboniltriazolinona, o agrupamento sulfonamida é um componente de uma ponte sulfonilaminocarbonil ($-S(=O)_2NHC(=O)-$). Em herbicidas sulfonilaminocarboniltriazolinona a extremidade sulfonil da ponte sulfonilaminocarbonil está normalmente ligada ao anel fenil substituinte. Na extremidade oposta da ponte sulfonilaminocarbonil, o carbonil está ligado na posição 1 de um anel triazolinona, que normalmente é substituído com grupos como alquil e alcóxi. Em um herbicida triazolopirimidina a extremidade sulfonil da molécula de sulfonamida está ligado à posição 2 de um sistema de anéis [1,2,4] triazolopirimidina substituídos e os aminoácidos da extremidade da fração sulfonamida estão ligados a um aril substituídos, tipicamente a um grupo fenil, ou alternativamente a extremidade amino da fração sulfonamida está ligada à posição 2 de um sistema de anéis [1,2,4] triazolopirimidina substituído e a extremidade sulfonil da fração sulfonamida está ligada a um grupo aril, tipicamente piridinil, substituídos.

[00127] Exemplos representativos de herbicidas sulfonilureia úteis na presente invenção são aqueles da fórmula:

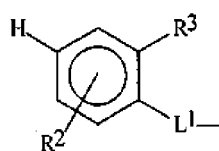


onde:

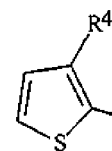
J é selecionado a partir do grupo constituído por:



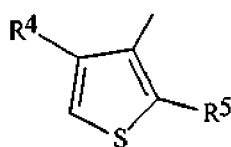
J-1



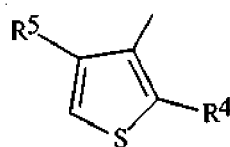
J-2



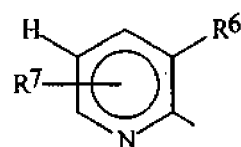
J-3



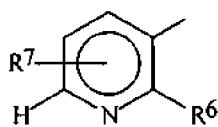
J-4



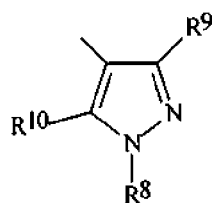
J-5



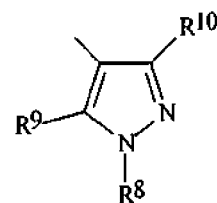
J-6



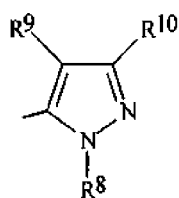
J-7



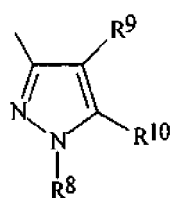
J-8



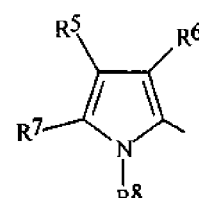
J-9



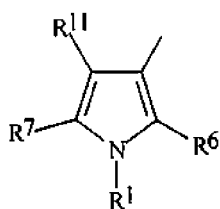
J-10



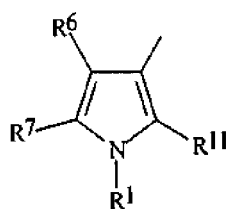
J-11



J-12

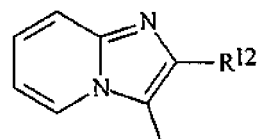


J-13



J-14

and



J-15

J é R¹³SO₂N(CH₃)-;

R é H ou CH₃;

R¹ é F, Cl, Br, NO₂, C₁-C₄ alquil, C₁-C₄ haloalquil, C₃-C₄ cicloalquil, C₂-C₄ haloalquenil, C₁-C₄ alcóxi, C₁-C₄ haloalcóxi, C₂-C₄ alcóxi-alcóxi, CO₂R¹⁴, C(O)NR¹⁵R¹⁶, SO₂NR¹⁷R¹⁸, S(O)_nR¹⁹, C(O)R²⁰, CH₂CN ou L;

R² é H, F, Cl, Br, I, CN, CH₃, OCH₃, SCH₃, CF₃ ou OCF₂H;

R³ é Cl, NO₂, CO₂CH₃, CO₂CH₂CH₃, C(O)CH₃, C(O)CH₂CH₃, C(O)-ciclopropil, SO₂N(CH₃)₂, SO₂CH₃, SO₂CH₂CH₃, OCH₃ ou OCH₂CH₃;

R⁴ é C₁-C₃ alquil, C₁-C₂ haloalquil, C₁-C₂ alcóxi, C₂-C₄ haloalquenil, F, Cl, Br, NO₂, CO₂R¹⁴, C(O)NR¹⁵R¹⁶, SO₂NR¹⁷R¹⁸, S(O)_nR¹⁹, C(O)R²⁰ ou L;

R⁵ é H, F, Cl, Br ou CH₃;

R⁶ é C₁-C₃ alquil substituído opcionalmente com 0-3 F, 0-1 Cl e 0-1 C₃-C₄ alcóxiacetilaxi, ou R⁶ é C₁-C₂ alcóxi, C₂-C₄ haloalquenil, F, Cl, Br, CO₂R¹⁴, C(O)NR¹⁵R¹⁶, SO₂NR¹⁷R¹⁸, S(O)_nR¹⁹, C(O)R²⁰ ou L;

R⁷ é H, F, Cl, CH₃ ou CF₃;

R⁸ é H, C₁-C₃ alquil ou piridinil;

R⁹ é C₁-C₃ alquil, C₁-C₂ alcóxi, F, Cl, Br, NO₂, CO₂R¹⁴, SO₂NR¹⁷R¹⁸, S(O)_nR¹⁹, OCF₂H, C(O)R²⁰, C₂-C₄ haloalquenil ou L;

R¹⁰ é H, Cl, F, Br, C₁-C₃ alquil ou C₁-C₂ alcóxi; R¹¹ é H, C₁-C₃ alquil, C₁-C₂ alcóxi, C₂-C₄ haloalquenil, F, Cl, Br, CO₂R¹⁴, C(O)NR¹⁵R¹⁶, SO₂NR¹⁷R¹⁸, S(O)_nR¹⁹, C(O)R²⁰ ou L;

R¹¹ é H, alquil C₁-C₃, alcóxi C₁-C₂, haloalquenil C₂-C₄, F, Cl, Br,

CO_2R^{14} , $\text{C}(\text{O})\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$, $\text{SO}_2\text{NR}^{17}\text{R}^{18}$, $\text{S}(\text{O})_n\text{R}^{19}$, $\text{C}(\text{O})\text{R}^{20}$ ou L.

R^{12} é halogênio, $\text{C}_1\text{-C}_4$ alquil ou $\text{C}_1\text{-C}_3$ alquilsulfonil;

R^{13} é $\text{C}_1\text{-C}_4$ alquil;

R^{14} é alil, propargil ou oxetan-3-yl; ou R^{14} é $\text{C}_1\text{-C}_3$ alquil substituído opcionalmente por pelo menos um membro independentemente selecionado a partir de halogênio, $\text{C}_1\text{-C}_2$ alcóxi e CN;

R^{15} é H, $\text{C}_1\text{-C}_3$ alquil ou $\text{C}_1\text{-C}_3$ alcóxi;

R^{16} é $\text{C}_1\text{-C}_2$ alquil;

R^{17} é H, $\text{C}_1\text{-C}_3$ alquil, $\text{C}_1\text{-C}_2$ alcóxi, alil ou ciclopropil;

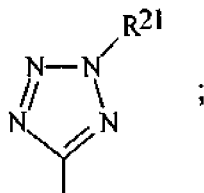
R^{18} é H ou $\text{C}_1\text{-C}_3$ alquil;

R^{19} é $\text{C}_1\text{-C}_3$ alquil, $\text{C}_1\text{-C}_3$ haloalquil, alil ou propargil;

R^{20} é $\text{C}_1\text{-C}_4$ alquil, $\text{C}_1\text{-C}_4$ haloalquil ou $\text{C}_3\text{-C}_5$ cicloalquil optionally substituted bi halogen;

n é 0, 1 ou 2;

L é:



L^1 é CH_2 , NH ou O;

R^{21} é H ou $\text{C}_1\text{-C}_3$ alquil;

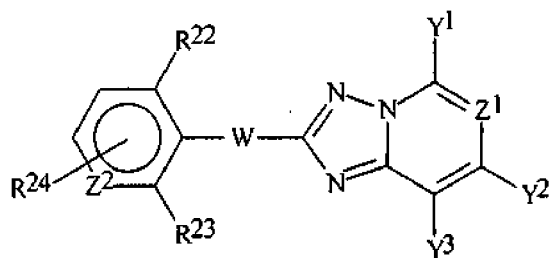
X é H, $\text{C}_1\text{-C}_4$ alquil, $\text{C}_1\text{-C}_4$ alcóxi, $\text{C}_1\text{-C}_4$ haloalcóxi, $\text{C}_1\text{-C}_4$ haloalquil, $\text{C}_1\text{-C}_4$ haloalquiltio, $\text{C}_1\text{-C}_4$ alquiltio, halogen, $\text{C}_2\text{-C}_5$ alcóxialquil, $\text{C}_2\text{-C}_5$ alcóxialcóxi, amino, $\text{C}_1\text{-C}_3$ alquilamino ou di($\text{C}_1\text{-C}_3$ alquil)amino;

Y é H, $\text{C}_1\text{-C}_4$ alquil, $\text{C}_1\text{-C}_4$ alcóxi, $\text{C}_1\text{-C}_4$ haloalcóxi, $\text{C}_1\text{-C}_4$ alquiltio, $\text{C}_1\text{-C}_4$ haloalquiltio, $\text{C}_2\text{-C}_5$ alcóxialquil, $\text{C}_2\text{-C}_5$ alcóxialcóxi, amino, $\text{C}_1\text{-C}_3$ alquilamino, di($\text{C}_1\text{-C}_3$ alquil)amino, $\text{C}_3\text{-C}_4$ alqueniloxi, $\text{C}_3\text{-C}_4$ alkiniloxi, $\text{C}_2\text{-C}_5$ alquiltioalquil, $\text{C}_2\text{-C}_5$ alquilsulfinilalquil, $\text{C}_2\text{-C}_5$ alquilsulfonilalquil, $\text{C}_1\text{-C}_4$ haloalquil, $\text{C}_2\text{-C}_4$ alquil, $\text{C}_3\text{-C}_5$ cicloalquil, azido ou ciano; e

Z é CH ou N;

desde que: (i) quando um ou ambos de X e I é C₁ haloalcóxi, quando Z é CH; e (ii) quando X é halogeno, quando Z é CH e I é OCH₃, OCH₂CH₃, N(OCH₃)CH₃, NHCH₃, N(CH₃)₂ ou OCF₂H. De nota é a composição herbicida líquida presente única compreendendo um ou mais sulfonilureias da Fórmula I em que o R⁶ é alquila, e a mencionada alquila não pode ser substituída.

[00128] Exemplos representativos de herbicidas triazolopirimidina contemplados para uso na presente invenção são aqueles da fórmula:



onde;

Cada R²² e R²³ é independentemente halogênio, nitro, C₁-C₄ alquila, C₁-C₄ haloalquil, C₁-C₄-alcoxi, C₁-C₄ haloalcóxi ou C₂-C₃ alcóxicarbonil;

R²⁴ é H, halogênio, C₁-C₂ alquil ou C₁-C₂ alcoxi;

W é -NHS(O)₂ – ou -S(O)₂NH-;

Y¹ é H, C₁-C₂ alquil ou C₁-C₂ alcoxi

Y² é H, F, Cl, Br, C₁-C₂ alquila ou C₁-C₂ alcóxi;

Y³ é H, F ou metoxi;

Z¹ é CH ou N; e

Z² é CH ou N,

desde que pelo menos um dos Y¹ e Y² seja diferente de H.

[00129] Na descrição Markush acima dos herbicidas triazolopirimidina representativos, quando W é -NHS(O)₂- a extremidade sulfonil do grupamento sulfonamida é ligado ao sistema de anéis [1,2,4]

triazolopirimidina e quando W é $-S(O)_2NH-$ a extremidade amino do grupo sulfonamida é ligada ao sistema de anéis [1,2,4] triazolopirimidina.

[00130] Nos acima citados, o termo "alquil", utilizados isoladamente ou em palavras compostas como "alquiltio" ou "haloalquil" incluem cadeias alquilas lineares e ramificadas, tais como, metil, etil, *n*-propil, *i*-propil, ou os diferentes isômeros butil. "Cicloalquil" inclui, por exemplo, ciclopropil, ciclobutil e ciclopentil. "Alquenil" incluem ou alquenos de cadeia linear ou cadeia ramificada, como etenil, 1-propenil, 2-propenil, e os diferentes isômeros butenil. "Alquenil" também incluem polienos tais como 1,2-propadienil e 2,4-butadienil. "Alquinil" incluem alcinos de cadeia linear ou cadeia ramificada, tais como etinil, 1-propinilo, 2-propinilo e os diferentes isômeros butinil. "Alquinil" pode também incluir moléculas compostas de múltiplas ligações triplas, como o 2,5-hexadiinil. "Alcoxi" inclui, por exemplo, metoxi, etoxi, *n*-propiloxi, isopropiloxi e os diferentes isômeros butoxi. "Alcoxialquil" indica substituições alcoxi no alquil. Exemplos de "alcoxialquil" incluem CH_3OCH_2 , $CH_3OCH_2CH_2$, $CH_3CH_2OCH_2$, $CH_3CH_2CH_2CH_2OCH_2$ e $CH_3CH_2OCH_2CH_2$. "Alcóxialcóxi" indica substituição alcóxi em alcóxi. "Alqueniloxi" inclui moléculas alqueniloxi de cadeia linear ou cadeia ramificada. Exemplos de "alqueniloxi" incluem $H_2C=CHCH_2O$, $(CH_3)CH=CHCH_2O$ e $CH_2=CHCH_2CH_2O$. "Alquiniloxi" inclui moléculas alquiniloxi de cadeia linear ou cadeia ramificada. Exemplos de "alquiniloxi" incluem $HC\equiv CCH_2O$ e $CH_3C\equiv CCH_2O$.

[00131] "Alquitio" inclui moléculas de alquitio de cadeia linear ou cadeia ramificada tais como metiltio, etiltio e os diferentes isômeros propiltio. "Alquiltioalquil" indica uma substituição alquiltioalquil no alquil. Exemplos de "alquiltioalquil" incluem CH_3SCH_2 , $CH_3SCH_2CH_2$, $CH_3CH_2SCH_2$, $CH_3CH_2CH_2CH_2SCH_2$ e $CH_3CH_2SCH_2CH_2$; "alquilsulfinilalquil" e "alquilsulfonilalquil" incluem os sulfóxidos e sulfonas correspondentes,

respectivamente. Outros substituintes como "alquilamino", "dialquilamino" são definidos de forma análoga.

[00132] O número total de átomos de carbono em um grupo substituinte é indicado por um prefixo "C_i-C_j" onde i e j são números de 1 a 5. Por exemplo, C₁-C₄ alquil designa de metil até butil, incluindo os vários isômeros. Como exemplos adicionais, C₂ alcóxialquil designa CH₃OCH₂; C₃ alcóxialquil designa, por exemplo, CH₃CH(OCH₃), CH₃OCH₂CH₂ ou CH₃CH₂OCH₂; e C₄ alcóxialquil designa os diversos isômeros de um grupo alquil substituído com um grupo alcóxi contendo um total de quatro átomos de carbono, incluindo exemplos como CH₃CH₂CH₂OCH₂ e CH₃CH₂OCH₂CH₂.

[00133] O termo "halogênio", isoladamente ou em palavras compostas como "haloalquil", inclui flúor, cloro, bromo ou iodo. Além disso, quando utilizado em palavras compostas como "haloaquil", o alquil mencionado pode ser parcialmente ou totalmente substituído com átomos de halogênios que podem ser similares ou diferentes. Exemplos de "haloalquil" incluem F₃C, ClCH₂, CF₃CH₂ e CF₃CCl₂. Os termos "haloalcóxi", "haloalquiltio", e outros similares, são definidos analogamente ao termo "haloalquil". Exemplos de "haloalcóxi" incluem CF₃O, CCl₃CH₂O, HCF₂CH₂CH₂O e CF₃CH₂O. Exemplos de "haloalquiltio" incluem CCl₃S, CF₃S, CCl₃CH₂S e ClCH₂CH₂CH₂S.

[00134] Os seguintes herbicidas sulfonilureia ilustram as sulfonilureias úteis para a presente invenção: amidosulfuron (N-[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil) amino] carbonil] amino]-sulfonil] -N-metilmetanesulfonamida), azimsulfuron (N-[[[(4,6-dimetoxi -2-pirimidinil) amino] carbonil]-1-metil-4-(2-metil-2H-tetrazol-5-il) -1/-pirazol-5-sulfonamida), bensulfuron-metil (metil 2 -[[[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil) amino] carbonil] amino] sulfonil] metil] benzoato), clorimuron-etil (etil 2 -[[[(4-cloro-6-metoxi-2-pirimidinil) amino] carbonil] amino] sulfonil]-benzoato), clorsulfuron (2-cloro-A /-[[[(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il) amino]-carbonilo] benzenossulfonamida),

cinosulfuron (N-[(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina-2-il)amino]carbonil]-2-(2-metoxietoxi)benzenossulfonamida), ciclosulfamuron (N-[[[2-(ciclopropilcarbonil) fenil] amino] sulfonil] -V1-(4,6-dimetoxipirimidin-2-il) ureia), etametsulfuron-metil (metil 2 -[[[[[4-etoxi-6 -(metilamino) -1,3,5-triazina-2-il] amino] carbonil] amino] sulfonil] benzoato de metila), etoxisulfuron (2-etoxifenil [[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil) amino] carbonil] sulfamato), Flazasulfuron (N-[[[4,6-dimetoxi-2-pirimidinil) amino] carbonil] -3 -(trifluorometil)-2-piridinesulfonamida), flucetosulfuron (1-[3-[[[[4,6-dimetoxi-2-pirimidinil)-amino] carbonil] amino] sulfonil]-2-piridinil]-2-fluoropropil metoxiacetato), flupirsulfuron-metil (metil 2 -[[[[[4,6-dimetoxi-2-pirimidinil) amino] carbonil]-amino] sulfonil]-6 -(trifluorometil)-3-piridinecarboxilato), foramsulfuron (2-[[[[[4,6-dimetoxi-2-pirimidinil) amino] carbonil] amino] sulfonil] -4 -(formilamino)-A /, A /-dimetilbenzamida), halosulfuron metil-(3-metil-5-cloro [[[[[4,6-dimetoxi-2-pirimidinil) amino] carbonil] amino] sulfonil] -1 -metil-1H-pirazole-4-carboxilato), imazossulfuron (2-cloro-N-[[[4,6-dimetoxi-2-pirimidinil) amino] carbonil]-imidazo [1,2-a] piridina-3-sulfonamida), iodosulfuron-metil (4-metil-2-iodo [[[[[4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il) amino] carbonil] amino] sulfonil] benzoato), mesossulfuron-metil (metil 2-[[[[[4,6-dimetoxi-2-pirimidinil) amino] carbonil]-amino] sulfonil] -4 -[[[(metilsulfonil) amino] metil] benzoato), metsulfuron-metil (2 -[[[[[4,6-dimetoxi-2-pirimidinil) amino] carbonil] amino] sulfonil]-benzoato), nicosulfuron (2 -[[[[[4,6-dimetoxi-2-pirimidinil) amino] carbonil] amino]-sulfonil]-A /, A/-dimetil-3-piridinecarboxamida), oxassulfuron (3-oxetanil 2 -[[[[[4, 6-dimetil-2-pirimidinil) amino] carbonil] amino] sulfonil] benzoato de metila), primisulfuron-metil (metil 2-[[[[[4,6-bis (trifluorometoxi) -2 - pirimidinil] amino] carbonil] amino] sulfonil] benzoato de metila), prosulfuron (N-[[[4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il) amino] carbonil]-2-(3,3,3-trifluoro-propil) benzenossulfonamida), pirazosulfuron-etil (etil 5 -[[[[[4,6-dimetoxi-2-pirimidinil) amino] carbonil] amino] sulfonil] -1-metil-1H-pirazole-4-carboxilato), rimsulfuron

(N-[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil) amino] carbonil]-3-(etilsulfonil)-2-piridinesulfonamida), sulfometuron-metil (metil 2-[[[(4,6 -dimetil-2-pirimidinil) amino] carbonil] amino] sulfonil] benzoato de metil), sulfossulfuron (N-[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil) amino] carbonil] -2 -(etilsulfonil) imidazo [1,2-a] piridina-3-sulfonamida), tifensulfuron-metil (metil 3 -[[[(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il) amino] carbonil] amino] sulfonil]-2-tiofenocarboxilato de metila), triassulfuron (2-(2-cloroetoxi)-N-[(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il) amino] carbonil] benzenossulfonamida), tribenuron-metil (metil 2-[[[N-(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazina-2-il)-N-metilamino] carbonil] amino]-sulfonil] benzoato), trifloxisulfuron (N-[(4,6-dimetoxi-2-pirimidinil) amino]-carbonil]-3-(2,2,2-trifluoroetoxi)-2-piridinesulfonamida), triflusulfuron-metil (metil 2-[[[[4-dimetilamino) -6 -(2,2,2-trifluoroetoxi) -1,3,5-triazina-2-il] amino]-carbonil] amino] sulfonil]-3-metilbenzoato) e tritosulfuron (N-[[[4-metoxi-6-(trifluorometil) -1,3,5-triazina-2-il] amino] carbonil] -2 -(trifluorometil) benzeno-sulfonamida).

[00135] Os seguintes herbicidas triazolopirimidina ilustram as triazolopirimidinas úteis para a presente invenção: cloransulam-metil (metil 3-cloro-2-[(5-etoxi-7-fluoro-[1,2,4] triazol [1,5-c] pirimidina-2-il) sulfonil] amino] benzoato, diclosulam (N-(2,6-diclorofenil)-5-etoxi-7-fluoro [1,2,4] triazol [1,5-c] pirimidina-2 - sulfonamida, florasulame (N-(2,6-difluorofenil)-8-fluoro-5-metoxi [1,2,4] triazol [1,5-c] pirimidina-2-sulfonamida), Flumetsulame (N-(2,6-difluorofenil)-5-metil [1,2,4] triazol [1,5-a] pirimidina-2-sulfonamida), METOSULAM (N-(2,6-dicloro-3-metilfenil) -5,7-dimetoxi [1,2,4] triazol [1,5-a] pirimidina-2-sulfonamida), penoxsulame (2 -(2,2-difluoroetoxi)-N-(5,8-dimetoxi [1, 2,4] triazol [1,5-c] pirimidina-2-il) -6 -(trifluorometil) benzenossulfonamida) e piroxsulam (N-(5,7-dimetoxi [1,2,4] triazol [1,5-c] pirimidina-2-il)-2-metoxi-4-(trifluorometil)-3-piridinesulfonamida).

[00136] Os seguintes herbicidas sulfonilaminocarboniltriazolinona ilustram as sulfonilaminocarboniltriazolinonas úteis para a presente invenção:

flucarbazona (4,5-dihidro-3-metoxi-4-metil-5-oxo-N-[[2-(trifluorometoxi)fenil]sulfonil]-1H-1,2,4-triazol-1-carboxamida) e procarbazona (metil2-[[[(4,5-dihidro-4-metil-5-oxo-3-propoxi-1H-1,2,4-triazol-1-il)carbonil]amino] sulfonil]benzoato).

[00137] Herbicidas adicionais incluem fenemedifame, triazolinonas e os herbicidas divulgados no documento WO2006/012981, incorporado ao presente pela referência em sua totalidade.

[00138] Os métodos adicionais incluem ainda a aplicação a uma cultura e ervas daninhas em um campo a pelo menos uma quantidade suficiente de herbicida ao qual a as sementes ou vegetal a ser cultivados são tolerantes, como, por exemplo, o glifosato, um inibidor da hidroxifenilpiruvatodioxigenase (por exemplo, mesotriona ou sulcotriona) , um inibidor fitoeno desaturase (por exemplo, diflufenican), um inibidor da síntese de pigmento, sulfonamida, imidazolinona, Bialafos, fosfinotricina, azafenidina, butafenacil, Sulfosato, glufosinato, triazolopfrimidina, pirimidiniloxi(tio)benzoato, ou sulonilaminocarbonil triazolinona, um inibidor da acetil Co-A carboxilase tais como quizalofop-P-etil, uma auxinas sintética, tais como quinclorac, ou um inibidor protox para controlar as ervas daninhas sem danificar significativamente as plantas cultivadas.

[00139] Geralmente, uma quantidade efetiva de herbicida aplicada ao campo é suficiente para controlar as ervas daninhas de maneira seletiva sem afetar significativamente a cultura. "Erva daninha", como utilizado no presente refere-se a uma planta que não é desejável em uma área específica. Inversamente, uma "cultura de plantas" ou "cultivo", da forma como é utilizada no presente refere-se a uma planta que é desejada em uma determinada área, como, por exemplo, uma planta de soja. Assim, em alguns exemplos de realização, uma erva daninha é uma planta não-cultivada ou uma espécie de vegetal não cultivado, enquanto que, em alguns exemplos de realização, uma erva daninha é uma espécie vegetal a qual se pretende

eliminar em uma determinada área, como, por exemplo, uma planta de soja inferior e/ou não-transgênica em um campo onde a soja evento DP-305423-1 esta sendo cultivada, ou uma planta de milho em um campo onde a soja DP-305423-1 está plantada. Ervas daninhas podem ser classificadas em dois grandes grupos: monocotiledôneas e dicotiledôneas.

[00140] Muitas espécies de plantas podem ser controladas (ou seja, mortas ou danificadas) pelos herbicidas descrito a seguir. Consequentemente, os métodos da presente invenção são úteis para o controle destas espécies vegetais nos locais onde elas são indesejáveis (ou seja, onde são consideradas como ervas daninhas). Estas espécies de plantas incluem plantas cultivadas, bem como espécies comumente consideradas como ervas daninhas incluindo, mas não limitados a espécies tais como: blackgrass (*Alopecurus myosuroides*), capim rabo-de-raposa (*Setaria faberi*), milha digitaria (*Digitaria sanguinalis*), suriname gramíneas (*Brachiaria decumbens*), bromo (*Avena fatua*), cocklebur comum (*Xanthium pensylvanicum*), erva de Santa Maria comum (*Chenopodium album*), manhã gloriosa (*morning glory*) (*Ipomoea coccinea*), quenopódio (*Amaranthus spp.*) velvetleaf (*Abutilon theophrasti*), capim-arroz comum (*Echinochloa crus-galli*), grama-bermudas (*Cynodon dactylon*), bromo pubescente (*Bromus tectorum*), pé-de-galinha (*Eleusine indica*), milha verde (*Setaria viridis*), Erva-castelhana (*Lolium multiflorum*), capim massambará (*Sorghum halepense*), Erva-cabecinha (*Phalaris minor*), windgrass (*Apera Spica-Venti*), wooly cupgrass (*Erichloa villosa*), chufa (*Cyperus esculentus*), morugem vulgar (*Stellaria media*), carpinera comum (*Ambrosia artemisiifolia*), *Kochia scoparia*, CONIZINA-DO-CANADÁ (*Conyza canadensis*), erva-febra (*Lolium rigidum*), capim-ganso (*Eleusine indica*), buva (*Conyza bonariensis*), transagem (*Plantago lanceolata*), trapoeraba (*Commelina benghalensis*), Corriola (*Convolvulus arvensis*), TIRIRICA-DO-BREJO (*Cyperus rotundus*), redvine

(*Brunnichia ovata*), *Sesbania exaltata* (*Sesbania exaltata*), fedegoso ou vagem-foice (*Senna obtusifolia*), *Helianthus ciliarise* e *Proboscidea louisianica*. Em outros exemplos de realização, as ervas daninhas compreende azevém resistente a um herbicida, por exemplo, um azevém resistente ao glifosato, um azevém resistente ao paraquato, um azevém resistente ao inibidor da ACCase, e um azevém resistente ao herbicida não seletivo. Em alguns exemplos de realização, as plantas indesejáveis são próximas as plantas cultivadas.

[00141] Conforme utilizado no presente, o termo "controlado seletivamente" significa que a maioria das ervas daninhas em uma área de cultivo são danificadas ou mortas de maneira significativa, enquanto que as espécies vegetais que estão também presentes no campo, não são significativamente danificadas. Assim, um método é considerado para controlar seletivamente ervas daninhas quando pelo menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais das ervas daninhas são danificadas ou mortas significativamente, enquanto que as espécies vegetais que estão também presentes no campo são significativamente danificadas ou mortas em menos de 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% ou 1%.

[00142] Em alguns exemplos de realização, uma planta de soja vento DP-305423-1 da presente invenção não é significativamente danificadas pelo tratamento com um determinado herbicida aplicado a planta, a uma dose equivalente a uma taxa de pelo menos 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 150, 170, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 800, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 ou mais de gramas ou onças (1 onça = 29,57 ml) de ingrediente ativo ou produto comercial ou formulação herbicida por acre ou por hectare, considerando que um vegetal controle adequado é significativamente prejudicado pelo mesmo tratamento.

[00143] Em exemplos de realização específicos, uma quantidade de herbicida inibidor de ALS compreende pelo menos cerca de: 0,1, 1,5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, ou mais gramas ou onças (1 onça = 29,57 ml) de ingrediente ativo por hectare. Em outros exemplos de realização, uma quantidade de um inibidor de ALS compreende pelo menos cerca de 0,1-50, cerca de 25-75, cerca de 50-100, cerca de 100-110, cerca de 110-120, cerca de 120-130, cerca de 130-140, cerca de 140-150, cerca de 150-200, cerca de 200-500, cerca de 500-600, cerca de 600-800, a cerca de 800-1000, ou mais gramas ou onças (1 onça = 29,57 ml) de ingrediente ativo por hectare. Qualquer inibidor de ALS, por exemplo, os listados na Tabela 2 podem ser aplicados nestes níveis.

[00144] Em outros exemplos de realização, uma quantidade efetiva de uma sulfonilureia compreende pelo menos 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 5000 ou mais gramas ou onças (1 onça = 29,57 ml) de ingrediente ativo por hectare. Em outros exemplos de realização, uma quantidade efetiva de uma sulfonilureia compreende pelo menos cerca de 0,1-50, cerca de 25-75, cerca de 50-100, cerca de 100-110, cerca de 110-120, cerca de 120-130, cerca de 130-140, de cerca de 140 -150, a cerca de 150-160, cerca de 160-170, cerca de 170-180, cerca de 190-200, cerca de 200-250, cerca de 250-300, cerca de 300-350, cerca de 350-400, cerca de 400-450, cerca de 450 -500, a cerca de 500-550, cerca de 550-600, cerca de 600-650, cerca de 650-700, cerca de 700-800, cerca de 800-900, a cerca de 900-1000, cerca de 1000-2000, ou mais gramas ou onças (1 onça = 29,57 ml) de ingrediente ativo por hectare. Sulfonilureias representativas que pode ser aplicadas a esta quantidade são estabelecidas na Tabela 2.

[00145] Em outros exemplos de realização, uma quantidade efetiva de sulfonilaminocarboniltriazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidiniloxi(tio) benzoatos e imidazolinonas podem representar, pelo menos, cerca de 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1800, 1850, 1900, 1950, 2000, 2500, 3500, 4000, 4500, 5000 ou mais gramas ou onças (1 onça = 29,57 ml) de ingredientes ativo por hectare. Em outros exemplos de realização, uma quantidade efetiva de um sulfoniluminocarboniltriazolinonas, triazolopirimidinas, pirimidiniloxi(tio) benzoatos, ou imidazolinonas compreendem pelo menos cerca de 0,1-50, cerca de 25-75, cerca de 50-100, cerca de 100-110, cerca de 110-120, cerca de 120-130, cerca de 130-140, cerca de 140-150, cerca de 150-160, cerca de 160-170, cerca de 170-180, cerca de 190-200, cerca de 200-250, cerca de 250-300, cerca de 300-350, cerca de 350-400, cerca de 400-450, cerca de 450-500, cerca de 500-550, cerca de 550-600, cerca de 600-650, cerca de 650-700, cerca de 700-800, cerca de 800-900, a cerca de 900-1000, cerca de 1000-2000, ou mais gramas ou onças (1 onça = 29,57 ml) de ingrediente ativo por hectare.

[00146] Variações adicionais nas quantidades efetivas de herbicidas podem ser encontradas, por exemplo, em várias publicações da *University Extension services*. Vide, por exemplo, Bernards *et al.* (2006) *Guide for Weed Management in Nebraska* (www.ianrpubs.url.edu/sendlt/ec130); Regherefal. (2005) “*Chemical Weed Control for Fields Crops, Pastures, Rangeland*”, e *Noncropland*, Kansas State University Agricultural Extension Station and Corporate Extension Service; Zollinger *et al.* (2006) *North Dakota Weed Control Guide*, Serviço de extensão da Dakota do Norte, e Iowa State University Extension em www.weeds.iastate.edu, cada qual é incorporado ao presente pela referência.

[00147] Herbicidas conhecidos por inibir a ALS variam em suas substâncias ativas, bem como em suas formulações químicas. Um técnico hábil no assunto está familiarizado com a determinação de uma quantidade efetiva de ingrediente ativo e/ou equivalente ácido presente em um determinado volume e/ou peso da preparação do herbicida.

[00148] As medidas nas quais o herbicida inibidor de ALS é aplicado na cultura, parte da cultura, sementes ou área de cultivo pode ser qualquer uma das medidas divulgadas no presente. Em exemplos de realização específicos, a medida para os herbicidas inibidores de ALS é de cerca de 0,1 a 5000 g ai/ha, cerca de 0,5 a 300 g ai/ha, ou cerca de 1 a cerca de 150 g ai/ha.

[00149] De modo geral, um determinado herbicida é aplicado a um campo específico (e a quaisquer plantas que crescem no mesmo) não mais do que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 vezes por ano, ou seja, não mais de 1, 2, 3, 4 ou 5 vezes por estação.

[00150] Pelo termo "tratados com uma combinação de" ou "aplicando uma combinação de herbicidas para a cultura, a área de cultivo ou campo" compreende-se que um determinado campo, cultura ou ervas daninhas são tratadas por cada um dos herbicidas e/ou produtos químicos indicados para ser parte da combinação, para que seja alcançado um efeito desejado, isto é, de modo que as ervas daninhas sejam seletivamente controladas enquanto que a cultura não seja significativamente danificada. Em alguns exemplos de realização, as ervas daninhas, que são suscetíveis a cada um dos herbicidas exibindo danos provenientes do tratamento com cada um dos herbicidas, que é aditivo ou sinérgico. A aplicação de cada herbicida e / ou químico pode ser simultânea ou as aplicações podem ocorrer em tempos diferentes, desde que o efeito desejado seja alcançado. Além disso, a aplicação pode ocorrer antes do plantio da safra.

[00151] As proporções de herbicidas utilizadas nos métodos da presente invenção com outros ingredientes herbicidas ativos nas composições herbicidas são geralmente numa proporção de 1:5000 a 5000:1, 1000:1 a 1:1000, 100:1 a 1:100, 10:1 a 1:10 ou 5:1 a 1:5 em peso. A relação ótima pode ser facilmente determinada por aqueles conhecedores do assunto Baseado no espectro desejado do controle de ervas daninhas. Além disso, quaisquer combinações de quantidades dos vários herbicidas diferentes divulgados na Tabela 2 também podem ser aplicados nos métodos da presente invenção.

[00152] Assim, em alguns exemplos de realização, a presente invenção fornece métodos melhorados para controlar seletivamente ervas daninhas em um campo onde a aplicação total de herbicida poderá ser inferior a 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, ou 1% da utilizada em outros métodos. Do mesmo modo, em alguns exemplos de realização, a quantidade de um determinado herbicida utilizado para controlar ervas daninhas seletivamente em um campo pode ser inferior a 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, ou 1% da quantidade em que determinados herbicidas que seriam utilizados em outros métodos, ou seja, métodos que não utilizam uma planta da presente invenção.

[00153] Conforme utilizado no presente, os termos "sinergia", "sinérgicos", "sinergicamente" e derivados destes termos, tal como em "efeito sinérgico" ou "combinação sinérgica de herbicidas" ou "composição sinérgica de herbicidas" referem-se a circunstâncias na qual a atividade biológica de uma combinação de herbicidas, tais como, pelo menos um primeiro e um segundo herbicida, é maior que a soma das atividades biológicas de cada um dos herbicidas separadamente. Sinergia, é expressa em termos de um "indicador de sinergia (SI)" geralmente pode ser determinado pelo método descrito por Kull *et al. Applied Microbiology* 9, 538 (1961). Vide também Colby "*Calculating*

Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations," Weeds 15, 20-22 (1967).

[00154] Da mesma forma, em alguns exemplos de realização, uma planta de soja evento DP-305423-1 apresenta uma tolerância melhorada a um ingrediente ativo de uma determinada formulação de herbicida em comparação com uma planta controle adequada. Herbicidas são vendidos comercialmente como formulações que tipicamente inclui outros ingredientes além do ingrediente ativo do herbicida; esses ingredientes são muitas vezes destinados a aumentar a eficácia do ingrediente ativo. Estes outros ingredientes podem incluir, por exemplo, protetores e adjuvantes (vide, por exemplo, Green e Foy (2003) "*Adjuvants: Tools for Enhancing Herbicide Performance*", em *Weed Biology and Management*, Ed. Inderjit (Kluwer Academic Publishers, Holanda)). Assim, uma planta de soja evento DP-305423-1 da presente invenção pode apresentar tolerância a uma determinada formulação de um herbicida (por exemplo, um determinado produto herbicida comercialmente disponível), isto é, no mínimo, 1%, 2%, 3%, 4%, 5 %, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15%, 17%, 20%, 22%, 25%, 27%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700% , 800%, 900%, 1000%, 1100%, 1200%, 1300%, 1400%, 1500%, 1,600%, 1700%, 1800%, 1900% ou 2000% ou mais superior do que a tolerância de uma planta controle adequada que contém apenas um único gene que confere tolerância a mesma formulação herbicida.

[00155] Em outros métodos, uma combinação de herbicida é aplicada sobre as plantas de soja DP-305423-1, de modo que a combinação de herbicidas produza um efeito sinérgico ou aditivo para controlar ervas daninhas. Essas combinações de herbicidas podem permitir que; a quantidade de aplicação seja reduzida, um espectro mais amplo de vegetação indesejável

seja controlado com poucas aplicações, início mais rápido da atividade herbicida, ou atividade herbicida mais prolongada.

[00156] Uma "composição herbicida aditiva" tem uma atividade herbicida que é praticamente equivalente aquela observada nos componentes individuais. A "combinação herbicida sinérgica" possui uma atividade herbicida superior aquela que pode ser esperada com base na atividade observada nos componentes individuais, quando usados isoladamente. Assim, o assunto divulgado atualmente fornece uma combinação herbicida sinérgica, onde o grau de controle de ervas daninhas, com a mistura é superior à soma do controle de herbicidas individuais. Em alguns exemplos de realização, o grau de controle de ervas daninhas da mistura excedeu à soma do controle dos herbicidas sozinhos por qualquer quantidade estatisticamente significativa, incluindo, por exemplo, cerca de 1% a 5%, cerca de 5% a 10%, cerca de 10% a 20%, cerca de 20% a 30%, cerca de 30% a 40%, cerca de 40% a 50%, cerca de 50% a 60%, cerca de 60% a 70%, cerca de 70% a 80% , cerca de 80% a 90%, cerca de 90% a 100%, cerca de 100% a 120% ou mais. Além disso, uma "quantidade efetiva sinergeticamente" de um herbicida se refere a quantidade de um herbicida necessário para suscitar um efeito sinérgico em outro herbicida presente na composição herbicida. Assim, o termo "sinergista" e derivações deste, refere-se a uma substância que aumenta a atividade de um ingrediente ativo (ai), ou seja, uma substância em uma formulação a partir da qual um efeito biológico é obtido, por exemplo, um herbicida.

[00157] Plantas da presente invenção podem ser cruzadas com plantas transgênicas que são tolerantes ao glifosato, para produzir descendentes que possuem tolerância ao glifosato e inibidores de ALS.

[00158] As ervas daninhas que podem ser de difícil controle apenas com glifosato em áreas onde uma planta é cultivada (como, por exemplo, a soja) incluem, mas não estão limitados aos seguintes: *horseweed*

(por exemplo, *Conyza canadensis*); azevém rígida, (por exemplo, *Lolium rigidum*); pé-de-galinha (por exemplo, *Eleusine indica*), Erva-castelhana (por exemplo, *Lolium multiflorum*); fleabane cabeluda (por exemplo, *Conyza bonariensis*); transagem (por exemplo, *Plantago lanceolata*); tasna comum (por exemplo, *Ambrosia artemisiifolia*); manhã gloriosa (*morning glory*) (por exemplo, *Ipomoea spp.*); amaranto (por exemplo, *Amaranthus spp.*); corriola (por exemplo, *Convolvulus arvensis*); chufa (por exemplo, *Cyperus esculentus*); erva de Santa Maria (por exemplo, *Chenopodium album*), trigo selvagens (por exemplo, *Polygonum convolvulus*); velvetleaf (por exemplo, *Abutilon theophrasti*); kochia (por exemplo, *kochia*) e trapoeraba (por exemplo, *Commelina spp.*). Nas áreas onde essas ervas daninhas são encontradas, a soja DP-305423-1 são particularmente úteis para permitir o tratamento de um terreno (e, portanto, qualquer cultivo crescendo no campo) com combinações de herbicidas que causam danos inaceitáveis às espécies vegetais que não possui estes polinucleotídeos que conferem resistência. Plantas da presente invenção que são tolerantes ao glifosato e outros herbicidas, tais como, por exemplo, sulfonilureia, imidazolinona, triazoloporimidina, pirimidinol (tio)benzoato, e/ou sulfonilaminocarboniltriazolinona, além de ser tolerante a pelo menos um outro herbicida, com um modo ou local de ação diferente são particularmente úteis em situações nas quais as ervas daninhas são tolerantes a pelo menos dois dos mesmos herbicidas que as plantas que são tolerantes. Desta forma, as plantas da presente invenção possibilitam um melhor controle das ervas daninhas que são tolerantes a mais de um herbicida.

[00159] Nos métodos da presente invenção, um herbicida pode ser formulado e aplicado a uma área de interesse, como, por exemplo, um campo ou área de cultivo, de qualquer forma adequada. Um herbicida pode ser aplicado a um campo de qualquer forma, como, por exemplo, por pulverização ou sob a forma líquida ou sólido em pó ou em grânulos. Em um exemplo de

realização específico, o herbicida ou combinação de herbicidas que são empregados nos métodos compreendem um tanque de mistura ou uma pré-mistura. Um herbicida pode também ser formulado, por exemplo, como uma "mistura homogênea granulada" produzida utilizando tecnologia de combinação (vide, por exemplo, Patente US 6.022.552, intitulado "*Uniform Mixtures of Pesticide Granules*"). A tecnologia de combinação da Patente US 6.022.552 produz uma mistura não segregante (ou seja., uma "mistura homogênea de grânulos") de produtos químicos formulados para a proteção das culturas na forma de grânulos secos que permite a entrega da misturas personalizadas destinadas a resolver problemas específicos. Uma mistura homogênea de grânulos pode ser enviada, manuseada, sub-amostrada e aplicada da mesma forma que os produtos tradicionais pré-misturados onde vários ingredientes ativos são formulados no mesmo grânulo.

[00160] Resumidamente, uma "mistura homogênea granulada" é preparada através da mistura de pelo menos, dois produtos granulares extrudados formulados. Em alguns exemplos de realização, cada produto granular contém uma formulação registrada contendo um único ingrediente ativo, que é, por exemplo, um herbicida, um fungicida e/ou um inseticida. A uniformidade (homogeneidade) de uma "mistura homogênea granular" pode ser otimizada pelo controle da dimensão relativa e distribuição de tamanho dos grânulos utilizado na mistura. O diâmetro dos grânulos extrusados é controlado pelo tamanho dos buracos no molde da extrusora, e um processo de peneirar por centrifugação pode ser utilizado para se obter uma população de grânulos extrusados com uma distribuição de tamanho desejado (vide, por exemplo, Patente US 6.270.025).

[00161] Uma mistura homogênea granular é considerado "homogênea", quando esta pode ser sub-amostradas em alíquotas de dimensões adequadas e a composição de cada alíquota irá satisfazer as

especificações da análise exigida. Para demonstrar a homogeneidade, uma grande amostra da mistura homogênea granular é preparada e é, então, sub-amostrada em alíquotas maiores que o tamanho mínimo da amostra estatística.

[00162] As misturas também oferecem a possibilidade de adicionar outros produtos agroquímicos em condições normais, uso marcado de quantidades de herbicidas adicionais (3º/4º mecanismo de ação), fungicidas, inseticidas, reguladores de crescimento e similares, com isso diminuindo os custos relacionados com aplicações adicionais.

[00163] Qualquer formulação herbicida aplicado sobre as plantas de soja DP-305423-1 pode ser preparada como uma composição "tanque-mix". Em tais exemplos de realização, cada ingrediente ou combinação de ingredientes podem ser armazenados separadamente um do outro. Os ingredientes podem então ser misturados antes da aplicação. Normalmente, essa mistura ocorre pouco tempo antes da aplicação. Em um processo de mistura no tanque, cada um dos ingredientes, antes da mistura, normalmente está presente na água ou um solvente orgânico adequado. Para obter orientação adicional sobre a técnica de formulação, Vide T. S. Woods, "*The Formulator's Toolbox-Product Forms for Modern Agriculture*" em *Pesticide Chemistry and Bioscience, The Food-Environment Challenge*, T. Brooks e T. R. Roberts, Eds., "*Proceedings of the 9th International Congress on Pesticide Chemistry, The Royal Society of Chemistry, Cambridge*", 1999, págs. 120-133. Veja também Patente US 3.235.361, Col. 6, linha 16 até Col. 7, linha 19 e exemplos 10-41; Patente US 3.309.192, col. 5, linha 43, até Col. 7, linha 62 e exemplos 8, 12, 15, 39, 41, 52, 53, 58, 132, 138-140, 162-164, 166, 167 e 169 - 182; Patente US 2.891.855, coluna 3, linha 66, até Col. 5, linha 17 e exemplos 1-4; Klingman, *Weed Control as a Science*, John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, 1961, págs 81-96; e Hance et al., *Weed Control Handbook*, 8ª Ed.,

Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989, cada um dos quais é incorporada ao presente pela referência em sua totalidade.

[00164] Os métodos da presente invenção permitem ainda o desenvolvimento de combinações de herbicida para serem utilizados com as plantas de soja DP-305423-1. Nestes métodos, são avaliadas as condições ambientais em uma área de cultivo. Condições ambientais que podem ser avaliadas incluem, mas não estão limitados a, a poluição das águas subterrâneas e superficiais, a utilização da cultura pretendida, tolerância das culturas, resíduos do solo, ervas daninhas presentes na área de cultivo, textura do solo, pH do solo, a quantidade de matéria orgânica no solo, equipamento de aplicação e prática agrícola. Após a avaliação das condições ambientais, uma quantidade efetiva de uma combinação de herbicidas pode ser aplicada à cultura, parte cultura, ou nas sementes da cultura ou área de cultivo.

[00165] Em alguns exemplos de realização, o herbicida aplicado nas plantas de soja DP-305423-1 da presente invenção serve para impedir o início do crescimento das ervas daninhas suscetíveis e/ou serve para causar danos às ervas daninhas que estão crescendo na área de interesse. Em alguns exemplos de realização, o herbicida ou mistura de herbicidas exercem estes efeitos sobre as ervas daninhas que afetam as culturas que são posteriormente plantadas em área de interesse (ou seja, o campo ou área de cultivo). Nos métodos da presente invenção, a aplicação da combinação de herbicida necessita não ocorrer ao mesmo tempo. Enquanto o campo onde a cultura é plantada tenha quantidades detectáveis do primeiro herbicida e o segundo herbicida é aplicado em algum momento durante o período em que a cultura está na área da cultura, a cultura é considerada como tendo sido tratada com uma mistura de herbicidas, de acordo com a presente invenção. Assim, os métodos da invenção abrangem aplicações de herbicidas, que são "pré-

emergente", "pós-emergente", "incorporação pré-plantio" e/ou que envolvem o tratamento das sementes antes do plantio.

[00166] Em um exemplo de realização, os métodos são fornecidos para o revestimento de sementes. Os métodos compreendem um revestimento de sementes com uma quantidade efetiva de um herbicida, ou uma combinação de herbicidas (como revelado no presente). As sementes podem então ser plantadas em uma área de cultivo. Outras sementes são fornecidas com um revestimento contendo uma quantidade efetiva de um herbicida, ou uma combinação de herbicidas (como revelado anteriormente no presente).

[00167] "Pré-emergente" refere-se a um herbicida, que é aplicado a uma área de interesse (por exemplo, um campo ou área de cultivo) antes de uma planta surgir visivelmente a partir do solo. "Pós-emergente" refere-se a um herbicida, que é aplicado a uma área depois que a planta surge visivelmente a partir do solo. Em alguns casos, os termos "pré-emergente" e "pós-emergente" são usados com referência a uma erva daninha em uma área de interesse e, em alguns casos, estes termos são usados com referência a uma cultura de plantas em uma área de interesse. Quando usado com referência para uma erva daninha, estes termos podem aplicar-se a apenas a um determinado tipo de erva ou espécies de ervas daninhas está presente ou que esteja presente na área de interesse. Embora qualquer herbicida possa ser aplicado em um tratamento pré-emergente e/ou pós-emergente, alguns herbicidas são conhecidos por serem mais efetivos no controle de ervas daninhas quando aplicados tanto como pré-emergente quanto pós-emergente. Por exemplo, o rimsulfuron tem tanto atividade pré-emergente quanto pós-emergente, enquanto outros herbicidas têm predominantemente atividade pré-emergente (metolaclo) ou pós-emergente (glifosato). Estas propriedades de herbicidas específicos são conhecidas no estado da técnica e são facilmente

determinadas por uma profissional hábil na técnica. Além disso, uma pessoa hábil na técnica seria facilmente capaz de selecionar um herbicida adequado e a quantidade de vezes de aplicação para o uso com a planta transgênica da presente invenção e/ou em áreas em que as plantas transgênicas da presente invenção são plantadas. A "incorporação pré-plantio" envolve a incorporação de compostos no solo antes do plantio.

[00168] O momento em que um herbicida é aplicado a uma área de interesse (e quaisquer plantas nesta) pode ser importante na otimização do controle de ervas daninhas. O momento em que um herbicida é aplicado pode ser determinado com referência ao tamanho das plantas e/ou a fase de crescimento e/ou desenvolvimento das plantas na área de interesse, por exemplo, das culturas ou ervas daninhas em crescimento na área. As fases de crescimento e/ou desenvolvimento das plantas são conhecidas no estado da técnica. Por exemplo, plantas de soja normalmente progridem através da fase de crescimento vegetativo conhecido como V_E (emergente), V_C (cotilédone), V_i (não foliar) e V_2 até V_N . A soja, em seguida, muda para a fase de crescimento reprodutivo em resposta ao foto período; estádios reprodutivos incluem R_1 (início do florescimento), R_2 (pleno florescimento), R_3 (início da vagem), R_4 (vagem completa), R_5 (início das sementes), R_6 (sementes completas), R_7 (início da maturidade) e R (maturação plena). Assim, por exemplo, o momento em que um herbicida ou outro produto químico é aplicado a uma área de interesse no qual as plantas estão crescendo pode ser o momento em que algumas ou todas as plantas em uma área particular, atingiram, pelo menos, uma dimensão particular e/ou fase de crescimento e/ou desenvolvimento, ou o momento em que algumas ou todas as plantas em uma área particular ainda não atingiram uma dimensão e/ou fase de crescimento e/ou desenvolvimento específico.

[00169] O termo "protetor" refere-se a uma substância que, quando adicionada a uma formulação herbicida elimina ou reduz os efeitos fitotóxicos do herbicida para determinadas culturas. Uma pessoa hábil no assunto irá apreciar que a escolha do protetor dependa, em parte, do cultivo de plantas de interesse ou do herbicida ou da combinação de herbicidas incluídas na composição herbicida sinérgica.

[00170] Protetores adequados exemplares para a utilização com as composições herbicidas divulgadas no presente incluem, mas não se limitam a, aquelas divulgadas nas Patentes US 4.808.208; 5.502.025; 6.124.240 e Pedidos de Patente US 2006/0148647, 2006/0030485, 2005/0233904, 2005/0049145, 2004/0224849, 2004/0224848, 2004/0224844, 2004/0157737, 2004/0018940, 2003/0171220, 2003/0130120, 2003/0078167, as divulgações das quais são incorporadas ao presente pela referência na sua totalidade. Os métodos da presente invenção podem envolver o uso dos herbicidas, em combinação com protetores de herbicidas, tais como benoxacor, BCS (1-bromo-4-[(clorometil) sulfonil] benzeno), cloquintocet-mexil, ciometrinil, diclormid, 2 - (diclorometil) -2-metil-1,3-dioxolano (MG 191), fenclorazol-etila, fenclorim, flurazole, fluxofenim, furilazol, isoxadifen-etila, mefenpir-dietila, metoxifenona ((4-metoxi-3-metilfenil) (3-metilfenil)-metanona), anidrido naftálico (1,8-anidrido naftálico) e oxabetrinil para aumentar a segurança da cultura. Quantidades efetivas de herbicidas de forma antidotal podem ser aplicadas ao mesmo tempo em que os compostos da presente invenção, ou aplicados como tratamentos de sementes.

[00171] Tratamento de sementes é particularmente útil para controlar de maneira seletiva as ervas daninhas, porque estas restringem fisicamente o antídoto nas plantas cultivadas. Por isso um exemplo de realização da presente invenção particularmente útil é um método para controlar seletivamente o crescimento de ervas daninhas em uma área que

inclui o tratamento das sementes a partir do qual a cultura é cultivada com uma quantidade efetiva na forma antidotal de protetor e tratando o campo com uma quantidade efetiva de herbicida para controlar as ervas daninhas. Quantidades efetivas na forma antidotal de protetores podem ser facilmente determinados por um técnico hábil no assunto através da simples experimentação. Uma quantidade efetiva na forma antidotal de um agente de proteção está presente sempre que uma planta desejada é tratada com o protetor de modo que o efeito de um herbicida sobre a planta é diminuído em comparação com o efeito do herbicida sobre uma planta que não foi tratado com o agente protetor; geralmente, uma quantidade efetiva na forma antidotal evita prejuízos ou danos severos às plantas tratadas com o agente de proteção. Um técnico hábil no assunto é capaz de determinar se a utilização de um agente de proteção é adequada e determinando a dose em que um agente de proteção deve ser administrado a uma cultura.

[00172] Em determinados exemplo de realização, a combinação de herbicidas protetores contém um primeiro inibidor de ALS e um segundo inibidor de ALS.

[00173] Essas misturas fornecem maior tolerância cultura (ou seja, uma diminuição da lesão causada pelo herbicida). Este método permite uma maior quantidade de aplicação dos compostos químicos pós ou pré-tratamento. Estes métodos são utilizados para um maior controle da vegetação indesejável. Em outros exemplos de realização, um agente de proteção é alcançado quando o cultivo de plantas de soja, parte da cultura, cultura das sementes, ervas daninhas, ou na área de cultivo é tratado com, pelo menos, um herbicida da família química da sulfonilureia, em combinação com pelo menos um herbicida da família das imidazolinonas. Este método oferece uma maior tolerância das culturas (ou seja, uma diminuição da lesão causada pelo

herbicida). Em exemplos de realização específicos, a sulfonilureia compreende rimsulfuron e as imidazolinonas compreendem imazetapir.

[00174] Conforme utilizado no presente, um "adjuvante" é qualquer material adicionado a uma solução de pulverização ou formulação para modificar a ação de um produto químico agrícola ou as propriedades físicas da solução de pulverização. Vide, por exemplo, Green e Foy (2003) "*Adjuvants: Tools for Enhancing Herbicide Performance*", em *Weed Biology and Management*, Ed. Inderjit (Kluwer Academic Publishers, Países Baixos). Adjuvantes podem ser classificados ou sub-classificados como ativadores, acidificantes, tampões, aditivos, aderentes, antifloculantes, anti-espumantes, anti congelantes, atraentes, combinantes básicos, agentes quelantes, clareantes, corantes ou tinturas, agentes de compatibilidade, co-solventes, acoplantes, óleos vegetais concentrados, agentes de deposição, detergentes, dispersantes, agentes de controle de sedimentos, emulsionantes, redutores de evaporação, diluentes, adubos, marcadores de espuma, formulantes, gases inertes, umidificantes, óleos de sementes metilados, COCs de cargas, polímeros, óleos vegetais modificados, penetrantes, repelentes, óleo de petróleo concentrado, conservantes, agentes *rainfast*, auxiliares de retenção, solubilizantes, tensoativos, espalhadores, adesivos autocolantes, sinergistas, espessantes, auxiliares de translocação, protetores UV, óleos vegetais, condicionadores aquosos e agentes umectantes.

[00175] Além disso, os métodos da invenção podem incluir a utilização de um herbicida ou a mistura de herbicidas, bem como um ou mais inseticidas, fungicidas, nematocidas, bactericidas, acaricidas, reguladores de crescimento, quimioesterelizantes, semi-químicos, repelentes, atraentes, feromonas, estimulantes de alimentação ou outros compostos biologicamente ativos ou bactérias, vírus ou fungos entomopatogênicos para formar uma mistura multi componente, dando um mesmo espectro amplo de proteção

agrícola. Exemplos destes protetores agrícolas que podem ser utilizados nos métodos da presente invenção incluem: inseticidas tais como abamectina, acefato, acetamiprida, amidoflomet (S-1955), avermectina, azadiractina, azinfos-metila, bifentrina, bifenazato, buprofezina, carbofuron, cartape, clorfenapir, clorfluazuron, clorpirifos, clorpirifos-metila, cromafenozida, clotianidina, ciflumetofen, ciflutrina, beta-ciflutrina, cialotrina, lambda-cialotrina, cipermetrina, ciromazina, deltametrina, diafentiuron, diazinon, dieldrina, diflubenzuron, dimeflutrin, dimetoato, dinotefuran, diofenolan, emamectina, endossulfon, esfenvalerato, etiprola, fenotiocarb, Fenoxicarbe, fempropatrina, fenvalerato, fipronil, flonicamida, flubendiamida, flucitrinato, tau-fluvalinato, flufenerim (UR-50701), flufenoxuron, fonofos, halofenozida, hexaflumuron, HIDRAMETILNON, imidacloprida, indoxacarbe, isofenfos, lufenuron, malatiom metaflumizona, metaldeído, metamidofos, metidation, metomil, metoprene, metoxicloro, metoflutrín, monocrotofos, metoxifenoazida, nitenpiram, nitiazine, novaluron, noviflumuron (XDE-007), oxamil, paration, paration-metila, permetrina, forato, fosadona, fosmete, fosfamidon, pirimicarbe, profenofos, proflutrín, pimeprozina, pirafloprole, piretrin, piridallil, piriprole, Piriproxifen, rotenona, rianodina, espinosade, espirodiclofen, espiromesifen (BSN 2060), spirotetramat, sulprofos, tebufenoazida, teflubenzuron, teflutrín, terbufos, tetracloprifos, tiacloprida, tiametoxame, tiodicarbe, tiosultap-sódio, tralometrin, triazamato, Triclorfon e triflumuron; fungicidas tais como acibenzolar, aldimorf, amisulbrom, azaconazole, azoxistrobina, benalaxil, benomil, bentiavalicarbe, bentiavalicarbe-isopropil, binomial, bifenilo, bitertanol, blasticidin-S, Bordéus mistura (sulfato de cobre tribásico), boscalide / nicobifena, bromuconazol, bupirimato, butiobate, carboxin, carpropamid, captafol, captano, carbendazime, cloroneb, clortalonil, clozolinato, clotrimazole, oxicloreto de cobre, sais de cobre, como sulfato de cobre e hidróxido de cobre, ciazofamida, ciflunamid, cimoxanil, ciproconazol, ciprodinil, diclofluanida, diclocimet, diclomezine,

dicloran, dietofencarb, difenoconazol, dimetomorfe, dimoxistrobina, diniconazole, diniconazole-M, dinocape, discostrobin, ditianona, dodemorf, dodina, econazole, etaconazole, edifenfos, epoxiconazol, etaboxam, etirimol, etridiazole, famoxadona, fenamidona, fenarimol, fenbuconazole, fencaramid, fenfuram, fenhexamida, fenoxanil, fencpiclonil, fenpropidin, fenepropimorfe, acetato de fentina, hidróxido de fentina, ferbame, ferfurazoate, ferimzone, fluazinam, fludioxonil, flumetover, fluopicolida, fluoxastrobina, fluquinconazole, fluquinconazole, flusilazol, flusulfamida, flutolanil, flutriafol, folpete, fosetil-alumínio, fuberidazole, furalaxil, furametapir, hexaconazol, himexazole, guazatine, imazalil, imibenconazole, iminoctadina, iodicarb, ipconazole, iprobenfos, iprodiona, iprovalicarbe, isoconazole, isoprotiolane, casugamicina, cresoxime-metila, mancozebe, mandipropamida, manebe mapanipirin, mefenoxame, mepronil, metalaxil, metconazol, metasulfocarb, metirame, metominostrobin / fenominostrobin, mepanipirime, metrafenona, miconazol, miclobutanil, neo-asozin (metanearsonato férrico), nuarimol, octilinona, ofurace, orisastrobin, oxadixil, ácido oxolínico, oxpoconazol oxicarboxin, paclobutrazol, penconazol, pencicuron, pentiopirad, perfurazoate, ácido fosfônico, ftalida, picobenzamid, picoxistrobina, polioxina, probenazole, procloraz, procimidona, propamocarbe, propamocarbe-hidroclorida, propiconazol, propinebe, proquinazida, protioconazol, piraclostrobina, priazofos, pirifenox, pirimetanil, pirifenox, pirolnitrine, piroquilon, quinconazole, quinoxifena, quintozeno, siltiofama, simeconazol, espiroxamina, estreptomicina, enxofre, tebuconazol, tecrazene, tecloftalam, tecnazeno, tetraconazol, tiabendazol, tifluzamida, tiofanato, tiofanato-metila, tiram, tiadinil, tolclofos-metila, tolifluanid, triadimefon, triadimenol, triarimol, triazoxida, tridemorfe, trimoprhamide triciclazole, trifloxistrobina, triforine, triticonazol, uniconazole, validamicin, vinclozolina e zinebe, ziram, e zoxamida; nematocidas, como aldicarbe, oxamil e fenamifos; bactericidas, como a estreptomicina, acaricidas, como amitraz, cinometionat,

clorobenzilato, cihexatin, dicofol, dienoclor, etoxazol, fenazaquin, óxido de fenbutatin, fempropatrina, fempiroximato, hexitiazox, propargite, piridaben e tebufenpirad; e biológicos, incluindo bactérias entomopatogênicas, como *Bacillus turingiensis* ssp. *Aizawai*, *Bacillus turingiensis* ssp. *Kurstaki*, e as delta-endotoxinas encapsuladas do *Bacillus turingiensis* (por exemplo, Cellcap, MPV, MPVII), fungos entomopatogênicos, como os fungos verde muscardina e vírus entomopatogênicos incluindo o baculovírus, vírus nucleopolihedro (VPN), tais como HzNPV, AfNPV e vírus da Granulose (GV), tais como CpGV. A relação de peso destes vários parceiros diferentes nas composições das mistura (por exemplo, herbicidas) utilizados nos métodos da presente invenção estão tipicamente entre 100:1 e 1:100, ou entre 30:1 e 1:30, ou entre 10:1 e 1:10, ou entre 4:1 e 1:4.

[00176] A presente invenção também está relacionada a uma composição compreendendo uma quantidade biologicamente efetiva de um herbicida de interesse, ou uma mistura de herbicidas, e uma quantidade efetiva adicional de, pelo menos, um agente ou composto biologicamente ativo e podem ainda incluir, pelo menos um surfactante, um diluente sólido ou um diluente líquido. Exemplos de tais compostos ou agentes biologicamente ativos são: inseticidas, tais como abamectina, acefato, acetamiprida, amidoflomet (S-1955), avermectina, azadiractina, azinfos-metila, bifentrina, binfenazate, buprofezin, carbofuron, clorfenapir, clorfluazuron, clorpirifos, clorpirifos-metila, cromafenoazida, clotianidina, ciflutrina, beta - ciflutrina, cialotrina, lambda-cialotrina, cipermetrina, ciromazina, deltametrina, diafentiuron, diazinon, diflubenzuron, dimetoato, diofenolan, emamectina, endossulfon, esfenvalerato, etiprole, fenoticarb, Fenoxicarbe, fempropatrina, fenvalerato, fipronil, flonicamida, Flucitrinato, tau-fluvalinato, flufenerim (UR-50701), flufenoxuron, fonofos, halofenoazida, hexaflumuron, imidacloprida, indoxacarbe, isofenfos, lufenuron, malatiom metaldeído, metamidofos, metidation, metomil, metoprene,

metoxicloro, monocrotofos, metoxifenoza, nitiazin, novaluron, noviflumuron (XDE-007), oxamil, paration, paration-metila, a permetrina, Forato, Fosadona, fosmete, fosfamidon, pirimicarb, profenofos, pimeprozina piridil, Piriproxifen, rotenona, espinosade, spiromesifin (BSN 2060), sulprofos, tebufenoza, teflubenzuron, teflutrin, terbufos, tetraclorvinfos, tiacloprida, tiametoxame, tiodicarb, tiosultap-sódio, tralometrin, triclorfom e triflumuron; fungicidas tais como acibenzolar, azoxistrobin, benomil, blastidina-S, mistura Bordeaux (sulfato de cobre tribásico), bromuconazol, carpropamid, captafol, captane, carbendazim cloroneb , clorotalonil, oxicloreto de cobre, sais de cobre, ciflufenamida, cimoxanil, ciproconazol, ciprodinil, (S)-3,5-dicloro-N-(3-cloro-1-etil-1-metil-2-oxopropil)-4--metilbenzamida (RH 7281), diclocimet (S-2900), diclomezine, dicloran, difenoconazol, (S)-3,5-dihidro-5-metil-2-(metiltio)-5-fenil-3-(fenil-amino) -4H-imidazol-4-ona (RP 407.213), dimetomorfe, dimoxistrobina, diniconazole, diniconazole-M, dodina, edifenfos, epoxiconazol, famoxadona, fenamidona, fenarimol, fenbuconazole, fencaramid (SZX0722), fenpiclonil, fenpropidin, fenpropimorfe , acetato de fentina, hidróxido de fentina, fluazinam, fludioxonil, flumetover (RPA 403397), flumorf / flumorlin (SIP-L190), fluoxastrobina (HEC 5725), FLUQUINCONAZOLE, flusilazol, flutolanil, flutriafol, folpete, fosetil-alumínio, furalaxil, furametapir (S-82658), hexaconazol, ipconazole, iprobenfos, iprodiona, isoprotiolane, casugamicina, cresoxime-metila, mancozebe, maneb mefenoxame, mepronil, metalaxil, metconazol, metomino-strobin/fenominostrobin (SSF-126), metrafenona (AC375839), miclobutanil , neo-asozin (férico metano-arsonato), nicobifena (BAS 510), orisastrobin, oxadixil, penconazol, pencicuron, probenazol, procloraz, Propamocarbe, propiconazol, proquinazide (DPX-KQ926), protioconazol (JAU 6476), pirifenox, piraclostrobina, pirimetanil, piroquilon, quinoxifena, espiroxamina, enxofre, tebuconazol, tetraconazol, tiabendazol, tifulzamida, tiofanato-metila, tiram, tiadinil, triadimefon, triadimenol, triciclazole,

trifloxistrobina, triticonazol, validamicin e vinclozolina; nematocidas, como aldicarbe, oxamil e fenamifos; bactericidas tais como a estreptomicina, acaricidas, como amitraz, cinometionat, clorobenzilato, cihexatin, dicofol, dienoclor, etoxazol, fenazaquin, óxido de fenbutatin, fempropatrina, fempiroximato, hexitiazox, propargite, piridaben e tebufenpirad; e biológicos, incluindo bactérias entomopatogênicas, como o *Bacillus turingiensis* ssp. Aizawai, *Bacillus turingiensis* ssp. Kurstaki, e as delta-endotoxinas encapsulados dos *Bacillus turingiensis* (por exemplo, Cellcap, MPV, MPVII), fungos entomopatogênicos, como os fungos verde muscardina e vírus entomopatogênicos incluindo baculovírus, nucleopolihedro vírus (VPN), tais como HzNPV, AfNPV e vírus Granulose (GV), tais como CpGV. Os métodos da invenção também podem incluir o uso de plantas geneticamente modificadas para expressar proteínas tóxicas para parasitas invertebrados (como as delta-endotoxinas do *Bacillus turingiensis*). Nesses exemplos de realizações, o efeito dos compostos anti parasitas invertebrados aplicados de maneira exógena pode ser sinérgico com a proteína toxina expressa.

[00177] Referências gerais para estes protetores agrícolas incluem *The Pesticide Manual*, 13ª Edição, C.D.S. Tomlin, Ed., British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, Reino Unido, 2003 e "*The BioPesticide Manual*", 2ª Edição, L. G. Copping, Ed., British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, Reino Unido, 2001.

[00178] Em certos casos, combinações com outros compostos de controle de pestes invertebradas ou agentes que possui um espectro de controle semelhante, mas um modo de ação diferente irá ser particularmente vantajoso para o manejo da resistência. Assim, composições da presente invenção podem ainda incluir uma quantidade biologicamente efetiva de, pelo menos, um composto de controle de pestes invertebradas ou agentes que possui um espectro de controle semelhante, mas um modo de ação diferente.

Colocando em contato uma planta geneticamente modificada para expressar um composto de proteção vegetal (por exemplo, proteínas), ou o *locus* da planta com uma quantidade biologicamente efetiva de um composto da presente invenção podem também proporcionar um espectro mais amplo de proteção vegetal e ser vantajoso para o manejo da resistência.

[00179] Desta forma, os métodos da presente invenção empregam um herbicida ou combinação de herbicidas e pode ainda incluir o uso de inseticidas e/ou fungicidas, e/ou outros produtos químicos agrícolas, como fertilizantes. A utilização desses tratamentos combinados da invenção pode ampliar o espectro de atividade contra espécies adicionais de ervas daninhas e suprimem a proliferação de quaisquer biótipos resistentes.

[00180] Os métodos da presente invenção podem ainda incluir a utilização de reguladores de crescimento, tais como aviglicina, *N*-(fenilmetil)-1*H*-purina-6-amina, etefon, epocoleona, ácido giberélico, giberelina A₄ e A₇, proteína em grampo, cloreto de mepiquat, prohexadiona de cálcio, prohidrojasmona, sódica e nitrofenolato trinexapac-metil, e organismos modificadores do crescimento vegetal, tais como *Bacillus cereus* de cepa BP01.

[00181] Exemplos de realização da presente invenção são adicionalmente definidos nos seguintes exemplos. Deve ser compreendido que estes exemplos são fornecidos apenas a título de ilustração. A partir da discussão acima e destes exemplos, um técnico hábil no assunto pode determinar as características essenciais da presente invenção, e sem se afastar do espírito e do escopo da presente invenção, pode fazer várias alterações e modificações nos exemplos de realização da invenção para a sua adaptação aos diversos usos e condições. Assim, várias modificações de exemplos de realização da presente invenção, além daqueles mostrados e descritos a seguir, serão evidentes para aqueles hábeis na técnica a partir da

descrição acima exposta. É também pretendido que tais modificações caiam no escopo das reivindicações anexas.

EXEMPLO 1

MATERIAL GENÉTICO UTILIZADO PARA PRODUIR O EVENTO DP-305423-1

[00182] A soja (*Glycine max*) evento DP-305423-1 foi produzida pelo co-bombardeamento de partículas com fragmentos PHP19340A (Figura 1, SEQ ID NO: 1) e PHP17752A (Figura 2; SEQ ID NO:2). Um resumo dos elementos e suas posições no fragmento PHP19340A são apresentados na tabela 3 e para o fragmento PHP17752A na Tabela 4. Estes fragmentos foram obtidos pela digestão com *Asc* a partir de um plasmídeo fonte. O fragmento PHP19340A foi obtido a partir de plasmídeo PHP19340 (Figura 3; SEQ ID NO: 3) e o fragmento PHP17752A foi obtido a partir de plasmídeo PHP17752 (Figura 4; SEQ ID NO: 4). Um resumo dos elementos e sua posição em cada um dos plasmídeos, PHP19340 e PHP17752, estão descritos nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

[00183] O fragmento PHP19340A contém uma cassete com um fragmento de 597 pb do gene 1 microssomal ômega-6 desaturase da soja (gm-fad2-1) (Heppard *et al.*, 1996). A presença do fragmento GM-fad2-1 no cassete de expressão age suprimindo a expressão da ômega-6 desaturase endógena, resultando em um aumento no nível de ácido oleico e diminuição dos níveis ácidos palmítico, linoleico e linolênico. A montante do fragmento GM-fad2-1 está a região promotora do gene 3 inibidor da tripsina Kunitz 3 (Kti3) (Jofuku e Goldberg, 1989; Jofuku *et al.*, 1989) que regula a transcrição da expressão. O promotor Kti3 é altamente ativo em embriões de soja e 1000 vezes menos ativo no tecido foliar (Jofuku e Goldberg, 1989). A região 3' não traduzida do gene da Kti3 (Kti3 terminador) (Jofuku e Goldberg, 1989) termina expressão deste cassete.

[00184] O fragmento PHP17752A contém uma cassete com uma versão modificada do gene acetolactato sintase da soja (*gm-hra*) que codifica a proteína *gm-hra* com dois resíduos aminoácidos modificados a partir da enzima endógena e cinco aminoácidos adicionais na região N-terminal da proteína derivada da tradução da região 5' não traduzida do gene da acetolactato sintase da soja (Falco e Li, 2003). O gene *gm-hra* que codifica uma forma da acetolactato sintase, que é tolerante a classe dos herbicidas sulfonilureia. A proteína *gm-hra* é composta de 656 aminoácidos e tem um peso molecular de aproximadamente 71 kDa.

[00185] A expressão do gene *gm-hra* é controlada pela região promotora 5' do gene S-adenosil-L-metionina sintetase (SAMS) da soja (Falco e Li, 2003). Esta região 5' é constituída por um promotor constitutivo e um *intron* que interrompe a região 5' não traduzida da SAMS (Falco e Li, 2003). O terminador para o gene *gm-hra* é o terminador da acetolactato sintase endógena da soja (terminador do *gm-als*) (Falco e Li, 2003).

TABELA 3

DESCRIÇÃO DOS ELEMENTOS GENÉTICOS DO FRAGMENTO PHP19340A

Localização no fragmento de DNA (posição dos pares de base)	Elementos Genéticos	Tamanho (pb)	Descrição
1 a 18	Região do Sítio Múltiplo de Clonagem (<i>polylinker</i>)	18	Região necessária para a clonagem de elementos genéticos
19 a 2102	Promotor KTi3	2084	Região promotora a partir do gene 3 do nibidor da tripsina Kunitz da soja (Jofuku and Goldberg, 1989; Jofuku <i>etal.</i> , 1989).

Localização no fragmento de DNA (posição dos pares de base)	Elementos Genéticos	Tamanho (pb)	Descrição
2103 a 2113	Região do Sítio Múltiplo de Clonagem (<i>polylinker</i>)	11	Região necessária para a clonagem de elementos genéticos
2114 a 2710	Fragmento <i>gm- fad2-1</i>	597	Fragmento do gene microsomal ômega-6 desaturase endógena (Heppard <i>et al.</i> , 1996)
2711 a 2720	Região do Sítio Múltiplo de Clonagem (<i>polylinker</i>)	10	Região necessária para a clonagem de elementos genéticos
2721 a 2916	Terminador KTi3	196	Região terminadora a partir do gene 3 do nibidor da tripsina Kunitz da soja (Jofuku and Goldberg, 1989; Jofuku <i>et al.</i> , 1989).
2917 a 2924	Região do Sítio Múltiplo de Clonagem (<i>polylinker</i>)	8	Região necessária para a clonagem de elementos genéticos

TABELA 4**DESCRIÇÃO DOS ELEMENTOS GENÉTICOS DO FRAGMENTO PHP17752A**

Localização no fragmento de DNA (posição dos pares de base)	Elementos Genéticos	Tamanho (pb)	Descrição
1 a 25	Região do Sítio Múltiplo de Clonagem	25	Região necessária para a clonagem de elementos genéticos

Localização no fragmento de DNA (posição dos pares de base)	Elementos Genéticos	Tamanho (pb)	Descrição
	<i>(polylinker)</i>		
26 a 76	FRT1	51	Sítio de recombinação da recombinase Flp (GenBank ID: AY737006.1).
77 a 222	Região do Sítio Múltiplo de Clonagem <i>(polylinker)</i>	145	Região necessária para a clonagem de elementos genéticos
223 a 867	Promotor SAMS	645	Porção promotora da região reguladora do gene SAMS (Falco e Li, 2003).
868 a 926	SAMS 5'-UTR	59	Região 5' não traduzida do gene SAMS (Falco e Li, 2003).
927 a 1517	<i>Intron</i> SAMS	591	Intron na região 5'-UTR do gene SAMS (Falco e Li, 2003).
1518 a 1533	SAMS 5'-UTR	16	região 5' não traduzida do gene SAMS (Falco e Li, 2003).
1534 a 3504	Gene <i>gm-hra</i>	1971	Versão modificada do gene da acetolactato sintase de soja com 15 nucleotídeos adicionais sobre a extremidade 5' (1534 a 1548) derivada da 5'-UTR <i>als</i> e duas alterações de nucleotídeos na sequência de codificação (Falco e Li, 2003).
3505 a 4156	Terminador <i>als</i>	652	Terminador nativo do gene da acetolactato sintase da soja (Falco e

Localização no fragmento de DNA (posição dos pares de base)	Elementos Genéticos	Tamanho (pb)	Descrição
			Li, 2003)
4157 a 4231	Região do Sítio Múltiplo de Clonagem (<i>polylinker</i>)	75	Região necessária para a clonagem de elementos genéticos
4232 a 4282	FRT1	51	Sítio de recombinação da recombinase Flp (GenBank ID: AY737006.1).
4283 a 4396	Região do Sítio Múltiplo de Clonagem (<i>polylinker</i>)	114	Região necessária para a clonagem de elementos genéticos
4397 a 4447	FRT6	51	Sítio de recombinação da recombinase Flp modificado (94% de homologia GenBank ID: AY737006.1)
4448 a 4512	Região do Sítio Múltiplo de Clonagem (<i>polylinker</i>)	65	Região necessária para a clonagem de elementos genéticos

TABELA 5**DESCRIÇÃO DOS ELEMENTOS GENÉTICOS DO PLASMÍDEO PHP19340**

Região	Localização no plasmídeo (posição em pares de base)	Elemento Genético conhecido	Tamanho (pb)	Descrição
--------	--	-----------------------------------	-----------------	-----------

Região	Localização no plasmídeo (posição em pares de base)	Elemento Genético conhecido	Tamanho (pb)	Descrição
Fragmento PHP19340A	2725 a 5438 1 a 210		2924	Vide Tabela 3 para os elementos e descrição dos fragmentos (fita complementar)
Plasmídeo construído	211 a 2724	elementos incluídos abaixo	2514	Vetores de DNA a partir de várias fontes para a construção e replicação plasmidial.
	228 a 351	Terminador T7	124	Terminador derivado do genoma do Fago T7 de enterobactérias (GenBank V01146; Dunn e Studier, 1983). (fita complementar)
	376 a 1326	Hyg	951	Gene de resistência a Higromicina do <i>Trypanosoma brucei</i> (GenBank AL671259; Gritz e Davies, 1983). (fita complementar)
	1404 a 1487	T7 promotor	84	Promotor derivado do genoma do fago T7 das Enterobactérias (GenBank V01146; Dunn e Studier, 1983). (fita complementar)
	1561 a 1930	Ori	370	Fragmento <i>Hae II</i> contendo a origem de replicação bacteriana (derivada da <i>colE1</i>) (TOMIZAWA et al., 1977).

TABELA 6**DESCRIÇÃO DOS ELEMENTOS GENÉTICOS DO PLASMÍDEO PHP17752**

Região	Localização no plasmídeo (posição em pares de base)	Elementos genéticos Conhecido	Tamanho (pares de base)	Descrição
Fragmento PHP17752A	2528 a 7026 1 a 13		4512	Vide a Tabela 4 para os elementos e descrição do fragmento (fita complementar)
Plasmídeo construído	14 a 2527	elementos incluídos abaixo	2514	Vetores de DNA a partir de várias fontes para a construção e replicação plasmidial.
	31 a 154	Terminador T7	124	Terminador derivado do genoma do Fago T7 de enterobactérias (GenBank V01146; Dunn e Studier, 1983). <i>(fita complementar)</i>
	179 a 1129 a	<i>Hyg</i>	951	Gene de resistência a Higromicina do Trypanosoma brucei (GenBank AL671259; Gritz e Davies, 1983). <i>(fita complementar)</i>
	1207 a 1290	Promotor T7	84	Promotor derivado do genoma do fago T7 das Enterobactérias (GenBank V01146; Dunn e Studier, 1983). <i>(fita complementar)</i>
	1364 a 1733	Ori	370	<i>Fragmento Hae II contendo a origem de replicação bacteriana (derivada da colE1) (TOMIZAWA et al., 1977).</i>

REFERÊNCIAS

[00186] Dunn, J. J. and Studier, F. W. 1983. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol* 166(4): 477-535.

[00187] Falco, C.S. e Li, Z. 2003. S-adenosyl-L-methionine Synthetase Promoter and Its Use in Expression of Transgenic Genes in Plants. US Patent Application: 2003/0226166.

[00188] Gritz, L. e Davies, J. 1983. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25: 179-188.

[00189] Heppard, E.P., Kinney, A.J., Stecca, K.L., and Miao, G.-H. 1996. Developmental and Growth Temperature Regulation of Two Different Microsomal omega-6 Desaturase Genes in Soybeans. *Plant Physiol.* 110: 311-319.

[00190] Jofuku, K.D. and Goldberg, R.B. 1989. Kunitz Trypsin Inhibitor Genes Are Differentially Expressed during the Soybean Life Cycle and in Transformed Tobacco Plants. *Plant Cell* 1: 1079-1093.

[00191] Jofuku, K.D. and Schipper, R.D. and Goldberg, R.B. 1989. A Frameshift Mutation Prevents Kunitz Trypsin Inhibitor mRNA Accumulation in Soybean Embryos. *Plant Cein*: 427-435.

[00192] Tomizawa, J.-I., Ohmori, H., and Bird, R. E. 1977. Origin of replication of colicin E1 plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74 (5): 1865-1869.

EXEMPLO 2

MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO E SELEÇÃO PARA A SOJA EVENTO DP-305423-1

[00193] Para a transformação do tecido da soja, uma porção linear de DNA, contendo a sequência do gene *gm-fad2-1* e os componentes necessários para regular a expressão, foi excisado do plasmídeo PHP19340 através do uso da enzima de restrição *Asc I* e purificado utilizando eletroforese em gel agarose. A porção linear de DNA, contendo as sequências do gene *gm-hra* e os componentes reguladores necessários para a expressão, foi excisado do plasmídeo PHP17752 através do uso da enzima de restrição *Asc I* e

purificado utilizando eletroforese em gel agarose. A porção linear de DNA contendo o gene *gm-fad2-1* é designado inserção PHP19340A e tem o tamanho de 2924 pb. A porção linear de DNA contendo o gene *gm-hra* é designado inserção PHP17752A e tem o tamanho de 4511pb. O único DNA introduzido no evento DP-305423-1 modificado foi a inserção de DNA acima descrita.

[00194] As plantas transgênicas do evento DP-305423-1 foram obtidas por bombardeamento micro projéteis usando um aparelho acelerador de micropartículas Biolistics® PDS-1000He "*particle gun*" fabricado pela Bio-Rad, essencialmente como descrito por Klein *et al.* ("*High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells*", *Nature* 327:70-73 (1987)). Os alvos para a transformação foram amontoado de fibras de embriões somáticos secundários derivados de explantes provenientes de pequenas sementes imaturas de soja. Os embriões somáticos secundários foram excisados a partir de explantes imaturos após várias semanas, em um meio de iniciação de cultura de soja. Os amontoado de fibras embriogênicos que foram excisados de explantes foram transferidos para um meio de manutenção líquido da cultura de soja, e sub-cultivado em intervalos regulares até estarem preparados para o bombardeamento.

[00195] As culturas embriogênicas somáticas de soja são utilizadas em experimentos de transformação a partir de 2-4 meses após o início. No dia da transformação, partículas de ouro microscópicas foram revestidas com uma mistura de DNA de dois fragmentos purificados PHP19340A e PHP17752A, e acelerados nas culturas embriogênicas de soja, após o qual os DNAs inseridos são incorporados em alguns cromossomos das células. Apenas PHP19340A e PHP17752A foram utilizados e nenhum DNA adicional (por exemplo, um DNA veículo) foi incorporado no processo de transformação. Após o bombardeamento, o tecido de soja bombardeado foi

transferido para frascos de meio de cultura líquida para a recuperação. Após alguns dias, o meio de cultura líquido em cada frasco de cultura de soja embriogênica bombardeada foi alterada para o meio de manutenção da cultura suplementado com clorsulfuron como o agente de seleção. Frascos individuais de tecido em meio líquido seletivo foram mantidos fisicamente separados durante a cultura, bem como a maioria dos amontoados de fibras embriogênicas somáticas dentro de cada frasco no meio líquido seletivo.

[00196] Depois de várias semanas em meio de manutenção da cultura suplementado com clorsulfuron, pequenas ilhas de tecido verde saudáveis, resistentes a clorsulfuron tornou-se visível crescendo para fora de peças de tecido embriogênico somático morto. A grumos embriogênicos resistentes foram excisados de suas peças associadas de tecido morto, e foi atribuída uma código de identificação único representando eventos putativo de transformação. Os eventos putativos individuais receberam trocas regulares de meio de seleção líquido fresco até o início do processo de regeneração. Amostras de tecido embriogênico foram colhidas para análises moleculares para confirmar a presença do transgene *gm-fad2-1* e *gm-hra* pela análise de *Southern*. As plantas foram regeneradas a partir de tecidos derivados de cada evento único e transferidas para a estufa para produção de sementes.

EXEMPLO 3

ANÁLISE POR SOUTHERN DE PLANTAS QUE CONTENHAM O EVENTO PD-305423-1

[00197] *Materiais e Métodos:* O DNA genômico foi extraído do tecido foliar congelado da soja de plantas individuais das gerações T4 e T5 do DP-305423-1 e do controlo (variedade: Jack), utilizando um método de tampão de Extração em Ureia padrão. O DNA genômico foi quantificado em um espectrofluorímetro utilizando o reagente *Pico Green*[®] (Molecular Probes, Invitrogen). Cerca de 4 µg de DNA por amostra foi digerido com *Hind III* ou *Nco I*. Para amostras de controle positivo, cerca de 3 pg (2 equivalentes cópia

genoma) do plasmídeo PHP19340 ou PHP17752 foi adicionado ao DNA genômico da soja controle antes da digestão. Amostras de controle negativo consistiram do DNA genômico da soja não modificada (variedade: Jack). Fragmentos de DNA foram separados por tamanho usando eletroforese em gel de agarose.

[00198] Após a eletroforese em gel agarose, os fragmentos de DNA foram separados depurinados, desnaturados, neutralizados de maneira *in situ*, e transferidos para uma membrana de nylon em tampão SSC 20x utilizando o método como descrito por TURBOBLOTTER® *Rapid Downward Transfer System* (Schleicher & Schuell). Após a transferência para a membrana, o DNA foi ligado à membrana por reticulação em UV.

[00199] Sondas de DNA para a *gm-fad2-1* e *gm-hra* foram marcadas com digoxigenina (DIG) por PCR utilizando o kit “*PCR DIG Probe Synthesis Kit*” (Roche).

[00200] As sondas marcadas foram hibridizadas ao DNA alvo nas membranas de nylon para a detecção dos fragmentos específicos usando a solução *DIG Easy Hyb solution* (Roche) essencialmente como descrito pelo fabricante. Após a hibridização, lavagens foram realizadas em condições de alta estrigência. As sondas hibridizadas marcadas com DIG aos fragmentos ligados foram detectadas utilizando o sistema de detecção “*CDP-Star Chemiluminescent Nucleic Acid Detection System*” (Roche). Os *Blots* foram expostos ao filme de raios-X à temperatura ambiente durante uma hora ou mais pontos para detectar os fragmentos hibridizados.

[00201] Resumo da análise por *Southern* do DP-305423-1: Mapas esquemáticos dos plasmídeos PHP19340 (SEQ ID NO: 3) e PHP17752 (SEQ ID NO: 4) utilizados como controles positivos sobre estes *Blots* são apresentados nas figuras 3 e 4, respectivamente. Estes plasmídeos foram as fontes dos fragmentos PHP19340A (Figura 1; SEQ ID NO: 1) e PHP17752A

(Figura 2; SEQ ID NO: 2). Os fragmentos foram isolados por digestão com *Asc* I da fonte plasmidial correspondente. DP-305423-1 foi obtido por transformação com co-bombardeamento de partículas utilizando fragmentos PHP19340A e PHP17752A.

[00202] O DNA genômico isolado a partir do tecido foliar da soja de plantas individuais DP-305423-1 (geração T5 e T4) e do controle inalterado (Jack) foram digeridos com *Hind III* e analisadas com uma sonda para o gene *gm-fad1A* (Figura 5, Tabela 7) . Cerca de 2 µg de DNA genômico foram digeridos e carregados em cada faixa. O controle do numero de cópias do gene incluídos no plasmídio PHP19340 e PHP17752 indica o número aproximado de cópia de gene e 2 µg de controle inalterado DNA. Os tamanhos dos marcadores de peso molecular da DIG VII são indicados adjacentes a imagem do *blot* em kilobase de pares (kb). Uma descrição de cada faixa é apresentada na Tabela 7.

TABELA 7

ANÁLISE POR SOUTHERN BLOT DO DP-305423-1: DIGESTÃO COM *HIND III*, SONDA

QM-FAD2-1

Linha	Amostra	Linha	Amostra
1	2 cópias PHP19340 + Controle	11	DP-305423-1/T38 (geração T4)
2	DIGVII	12	DP-305423-1/T39 (geração T4)
3	Controle	13	DP-305423-1/T40 (geração T4)
4	DP-305423-1/T8 (geração T5)	14	DP-305423-1/T41 (geração T4)
5	DP-305423-1/T9 (geração T5)	15	DP-305423-1/T42 (geração T4)
6	DP-305423-1/T10 (geração T5)	16	DP-305423-1/T43 (geração T4)
7	DP-305423-1/T11 (geração T5)	17	DP-305423-1/T44 (geração T4)
8	DP-305423-1 /T12 (geração T5)	18	Controle
9	DP-305423-1/T13 (geração T5)	19	DIGVII
10	DP-305423-1/T14 (geração T5)	20	2 cópias PHP17752 +Controle

[00203] O DNA genômico isolado a partir do tecido foliar da soja de plantas individuais DP-305423-1 (geração T5 e T4) e do controle inalterado (Jack) foram digeridos com *Hind III* e analisados com uma sonda para o gene *gm-fadIA* (Figura 6, Tabela 8). Aproximadamente cerca de 2 µg de DNA genômico foram digeridos e carregados em cada faixa. O controle do número de cópias do gene incluídos no plasmídio PHP19340 e PHP17752 indica o número aproximado de cópia de gene e 2 µg de controle inalterado DNA. Os tamanhos dos marcadores de peso molecular da DIG VII são indicados adjacentes a imagem do blot em kilobase de pares (kb). Uma descrição de cada faixa é apresentada na Tabela 8.

TABELA 8

ANÁLISE POR SOUTHERN BLOT DO DP-305423-1: DIGESTÃO COM Nco I, SONDA QM

FAD2-1

Linha	Amostra	Linha	Amostra
1	2 cópias PHP19340 + Controle	11	DP-305423-1/T38 (geração T4)
2	DIGVII	12	DP-305423-1/T39 (geração T4)
3	Controle	13	DP-305423-1/T40 (geração T4)
4	DP-305423-1/T8 (geração T5)	14	DP-305423-1/T41 (geração T4)
5	DP-305423-1/T9 (geração T5)	15	DP-305423-1/T42 (geração T4)
6	DP-305423-1/T10 (geração T5)	16	DP-305423-1/T43 (geração T4)
7	DP-305423-1/T11 (geração T5)	17	DP-305423-1 /T44 (geração T4)
8	DP-305423-1/T12 (geração T5)	18	Controle
9	DP-305423-1/T13 (geração T5)	19	DIGVII
10	DP-305423-1/T14 (geração T5)	20	2 cópias PHP17752 +Controle

[00204] O DNA genômico isolado a partir do tecido foliar da soja de plantas individuais DP-305423-1 (geração T5 e T4) e do controle inalterado (Jack) foram digeridos com *Hind III* e analisadas com uma sonda para o gene *gm-hra* (Figura 7, Tabela 9). Aproximadamente cerca de 2 µg de DNA

genômico foram digeridos e carregados em cada faixa. O controle do número de cópias do gene incluídos no plasmídio PHP19340 e PHP17752 indica o número aproximado de cópia de gene e 2 µg de controle inalterado DNA. Os tamanhos dos marcadores de peso molecular da DIG VII são indicados adjacentes a imagem do blot em kilobase de pares (kb). Uma descrição de cada faixa é apresentada na Tabela 9.

TABELA 9

ANÁLISE PO SOUTHERN BLOT DO DP-305423-1: DIGERIDO COM HIND III , SONDA QM-

<u>HRA</u>			
Linha	Amostra	Linha	Amostra
1	2 cópias PHP19340 + Controle	11	DP-305423-1/T38 (geração T4)
2	DIGVII	12	DP-305423-1/T39 (geração T4)
3	Controle	13	DP-305423-1/T40 (geração T4)
4	DP-305423-1/T8 (geração T5)	14	DP-305423-1/T41 (geração T4)
5	DP-305423-1/T9 (geração T5)	15	DP-305423-1 /T42 (geração T4)
6	DP-305423-1 mo (geração T5)	16	DP-305423-1/T43 (geração T4)
7	DP-305423-1/T11 (geração T5)	17	DP-305423-1/T44 (geração T4)
8	DP-305423-1/T12 (geração T5)	18	Controle
9	DP-305423-1/T13 (geração T5)	19	DIGVII
10	DP-305423-1/T14 (geração T5)	20	2 cópias PHP17752 +Controle

[00205] O DNA genômico isolado a partir do tecido foliar da soja de plantas individuais DP-305423-1 (geração T5 e T4) e do controle não modificado (Jack) foram digeridos com *Nco I* e sondadas com uma sonda para o gene *gm-hra*. Aproximadamente 2 µg de DNA genômico foram digeridos e carregados em cada faixa. O controle do número de cópias do gene incluídos no plasmídio PHP19340 e PHP17752 indica o número aproximado de cópia de gene e 2 µg de DNA controle não modificado. Os tamanhos dos marcadores de peso molecular da DIG VII são indicados adjacentes a imagem do *blot* em

kilobase de pares (kb). Uma descrição de cada faixa é apresentada na Tabela 10.

TABELA 10

ANÁLISE DE SOUTHERN BLOT DO DP-305423-1; DIGESTÃO COM *Nco I*, SONDA QM-

<u>HRA</u>			
Linha	Amostra	Linha	Amostra
1	2 cópias PHP19340 + Controle	11	DP-305423-1/T38 (geração T4)
2	DIGVII	12	DP-305423-1/T39 (geração T4)
3	Controle	13	DP-305423-1/T40 (geração T4)
4	DP-305423-1/T8 (geração T5)	14	DP-305423-1/T41 (geração T4)
5	DP-305423-1/T9 (geração T5)	15	DP-305423-1/T42 (geração T4)
6	DP-305423-1/T10 (geração T5)	16	DP-305423-1/T43 (geração T4)
7	DP-305423-1/T11 (geração T5)	17	DP-305423-1/T44 (geração T4)
8	DP-305423-1/T12 (geração T5)	18	Controle
9	DP-305423-1/T13 (geração T5)	19	DIGVII
10	DP-305423-1/T14 (geração T5)	20	2 cópias PHP17752 +Controle

[00206] As Tabelas 11 e 12 sumarizam os resultados das análises de *Southern blot* apresentadas nas Figuras de 5 até 8.

TABELA 11

RESUMO DA HIBRIDIZAÇÃO DE FRAGMENTOS ESPERADOS E OBSERVADOS NOS

SOUTHERN BLOTS COM A SONDA *GM-FAD2-1* PARA PD-1-305423-1

Geração	Enzima para digestão	Tamanho do fragmento esperado¹ (bp)	Tamanho esperado do plasmídeo (bp)²	Tamanho do fragmento observado no DP-305423-1 (bp)
T4 e T5 (Figura 5)	<i>Hind III</i>	1687	1687	~8600* ~8000* ~2400 1687 ³

Geração	Enzima para digestão	Tamanho do fragmento esperado ¹ (bp)	Tamanho esperado do plasmídeo (bp) ²	Tamanho do fragmento observado no DP-305423-1 (bp)
T4 e T5 (Figura 6)	<i>Nco I</i>	>2300 (borda)	3510	>8600* 3 bandas >8600 ~7400 ~6100 (Fraco) ~2900 ~900*

NOTAS DE RODAPÉ

*:Banda de hibridização que também estava presente nas amostras controle. Esta banda é determinada por ser a partir de sequências endógenas da variedade de origem *Jack* e não está relacionada com a inserção do DP-305423-1.

¹: Tamanho baseado no mapa do fragmento PHP19340A na Figura 2.

²: Tamanho baseado no mapa do plasmídeo PHP19340 na Figura 1.

³: Tamanho é o mesmo como o esperado devido à migração equivalente com o plasmídeo controle positivo.

TABELA 12

RESUMO DA HIBRIDIZAÇÃO DE FRAGMENTOS ESPERADOS E OBSERVADOS NOS

SOUTHERN BLOTS COM A SONDA GM-HRA PARA DP-305423-1

Geração	Enzima para digestão	Tamanho do fragmento esperado ¹ (bp)	Tamanho esperado do plasmídeo (bp) ²	Tamanho do fragmento observado no DP-305423-1 (bp)
---------	----------------------	---	---	--

Geração	Enzima para digestão	Tamanho do fragmento esperado ¹ (bp)	Tamanho esperado do plasmídeo (bp) ²	Tamanho do fragmento observado no DP-305423-1 (bp)
T4 e T5 (Figura 7)	<i>Hind</i> III	2418 1529	2418 1529	>8600* ~8600* ~7400* ~5700* ~4600* 2418 ³ ~2300* ~2100* 1529 ³ ~900*
T4 e T5 (Figura 8)	<i>Nco</i> I	>3000 (borda) >1500 (borda)	4214 2812	>8600* ~8000* ~6900* ~6100* ~5200* ~4900* ~4500* ~3600 ~3200 ~1600*

NOTAS DE RODAPÉ

*: Banda de hibridização que também estava presente nas amostras controle. Esta banda é determinada por ser a partir de sequências endógenas da variedade de origem Jack e não está relacionada com a inserção do DP-305423-1

¹: Tamanho baseado no mapa do fragmento PHP17752A na Figura 4.

²: Tamanho baseado no mapa do plasmídeo PHP17752 na Figura 3.

³: Tamanho é o mesmo como o esperado devido à migração equivalente com o

plasmídio controle positivo.

[00207] As digestões com *Hind III* foram realizadas em amostras de DNA genômico para avaliar fragmentos internos e a integridade de ambos PHP19340A (Figura 1; SEQ ID NO: 1) e PHP17752A (Figura 2; SEQ ID NO: 2) em todas as gerações T4 e T5 do PD - 305423-1. A *Nco I* foi selecionada para avaliar o número de cópia dos elementos *gm-fad2-1* e *gm-hra* no DP-305423-1 devido à presença de um único sítio da enzima de restrição em cada um dos fragmentos de transformação. O único sítio de restrição enzimática daria um único fragmento hibridizante para cada cópia de fragmento inserido do elemento *gm-fad2-1* e dois fragmentos hibridizantes para cada cópia do gene *gm-hra* (Tabelas 11 e 12, respectivamente). A borda do fragmento é obtida a partir de um sítio de restrição na inserção e o sítio de restrição mais próximo correspondente dentro do DNA genômico adjacente da planta. O número de fragmentos observados com as sondas *gm-fad2-1* e *gm-hra* forneceria uma estimativa do número de cópias do elemento dentro do DNA de inserção do DP-305423-1.

[00208] As sondas *gm-fad2-1* e *gm-hra* utilizadas para a análise por *Southern* foram altamente homólogas as sequências no genoma endógeno da soja e, portanto, fragmentos hibridizantes complementares eram esperados. Estas bandas hibridizantes foram determinadas pela sua presença nas amostras de controle negativo e estão indicadas nas Tabelas 11 e 12 por um asterisco (*).

[00209] Para verificar a integridade da região 3' da inserção PHP19340A, o *gm-fad2-1* foi hibridizado para o *blot* da *Hind III*. Um fragmento interno único de 1687 pb seria esperado com base na presença dos sítios *Hind III* no PHP19340A (Tabela 11, Figura 1). A banda esperada de 1687 pb foi observada e uma segunda banda de cerca de 2400 pb foi também observada (Figura 5). Além disso, a sonda *gm-fad2-1* hibridizava duas bandas adicionais

no PD-305423-1 que também estavam presentes nos controles e não eram provenientes da inserção do DP-305423-1 (Figura 5). A banda de 2400 pb é muito provavelmente devido a uma cópia parcial do PHP19340A contendo a região do *gm-fad2-1*. Estes resultados indicam a presença de cópias intactas do PHP19340A, bem como uma cópia parcial contendo o *gm-fad2-1* no PD-305423-1. Este padrão de hibridização é coerente em todas as gerações T4 e T5 das DP-305423-1 analisadas (Tabela 11).

[00210] Para determinar o número de cópias do elemento *gm-fad2-1* no PD-305423-1, a sonda *gm-fad2-1* foi hibridizada no *blot* para *Nco I*. Uma banda de fragmento maior que 2300 pb era esperada para cada cópia *gm-fad2-1* (Tabela 11, Figura 1). O *blot Nco I* hibridizado com a sonda *gm-fad2-1* exibiu seis fragmentos hibridizáveis (Figura 6). Os Tamanhos destes seis fragmentos hibridizáveis estão apresentados na Tabela II. Duas bandas adicionais foram observadas e determinadas como sendo provenientes do genoma endógeno da soja com base em sua presença nas amostras de controle negativo (Tabela 11, Figura 6). A presença de seis fragmentos hibridizáveis indica que há aproximadamente seis cópias integrais ou parciais de elementos *gm-fad2-1* inseridos no genoma do DP-305423-1. Este padrão de hibridização é coerente em todas as gerações T4 e T5 das DP-305423-1 analisadas (Tabela 11), indicando a estabilidade do DNA inserido.

[00211] A hibridização da sonda para *gm-hra* para o *blot* com *Hind III* verificaria a integridade do fragmento PHP17752A inserido como duas bandas internas de 1529 pb e 2418 pb esperadas com base na posição dos sítios *Hind III* no fragmento (Tabela 12, Figura 2). Estas duas bandas foram observadas na hibridização do *blot Hind III* com a sonda *gm-hra* (Tabela 12, Figura 7). Bandas hibridizantes adicionais foram observadas em ambas as linhas DP-305423-1 e controle, indicando que estas bandas foram decorrentes das sequências endógenas e não devido à inserção do DP-305423-1 (Tabela

12, Figura 7). A presença apenas das duas bandas transgênicas esperadas são uma indicação do fragmento PHP17752A intacto inserido no genoma. Tanto as gerações T4 e T5 da DP-305423-1 apresentaram o mesmo padrão de hibridização (Tabela 12).

[00212] A hibridização da sonda *gm-hra* no blot para *Nco I* verificaria o número de cópias do elemento no DP-305423-1. Dois fragmentos na borda, um maior que 1500 pb e o maior que 3000 pb, seriam esperados para cada cópia do elemento baseado na posição do sítio de restrição *Nco I* dentro do gene *gm-hra* no PHP17752A (Tabela 12, Figura 4). Duas bandas hibridizantes, uma de aproximadamente 3.200 pb e outra de 3.600 pb, foram observadas (Tabela 12, Figura 8). Bandas hibridizantes adicionais foram observadas tanto nas linhas do DP-305423-1 quanto nas linhas do controle, indicando que estas bandas foram provenientes das sequências endógenas e não devido à inserção do DP-305423-1 (Tabela 12, Figura 8). A presença de duas bandas transgênicas indica uma inserção do gene *gm-hra* no genoma DP-305423-1. Este padrão de hibridização é coerente em todas as gerações T4 e T5 das DP-305423-1 analisadas (Tabela 12), indicando estabilidade do DNA inserido.

[00213] Em resumo, estas combinações de enzimas de restrição e sondas mostraram padrões de hibridização consistentes ao longo de todas as análises individuais e entre as gerações de T4 e T5 do DP-305423-1. Com base nas análises aqui relatadas, parece existir cerca de seis cópias totais ou parciais do elemento *gm-fad2-1* e uma única cópia do gene *gm-hra* no genoma da DP-305423-1. Cópias intactas e parciais do PHP19340A e uma única cópia intacta do PHP17752A são similares por terem sido inseridas no genoma do DP-305423-1.

EXEMPLO 4**CONFIRMAÇÃO DO FENÓTIPO DE ALTO ÁCIDO OLEICO POR CROMATOGRAFIA****GASOSA (GC) E ANÁLISE DE SOUTHERN BLOT**

[00214] Antes do plantio, pequenas pastilhas de sementes foram retiradas (~ 2 mg) a partir de sementes cotilédones usando uma gilete. Foram preparados ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) a partir de uma única pastilha de semente de soja por transesterificação utilizando hidróxido trimetilsulfônio (TMSH) (Butte, 1983). As pastilhas de sementes são colocadas em um frasco de vidro de 1,5 ml de cromatografia gasosa contendo 50 µL de TMSH e 0,5 ml de heptano e incubadas durante 10 minutos em temperatura ambiente sob agitação. Os frascos são transferidos para frascos de prateleiras no cromatógrafo a gás. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados e quantificados (3 µL injetados a partir da camada de heptano), utilizando um cromatógrafo Hewlett-Packard 6890-2 equipado acoplado a uma coluna capilar de sílica Omegawax 320 (Supelco Inc., Bellfonte, PA) e um detector de ionização por chama (FID). A temperatura do forno está programada para manter a uma temperatura de 220°C por 5 min, aumentando para 240°C a 20°C/min, e mantida por mais um minuto. Um gerador de hidrogênio Whatman fornece um veículo gasoso e abastece o FID com hidrogênio. O tempo de retenção é comparado com aqueles para os ésteres metílicos de padrões disponíveis comercialmente (Nu-Chek Prep, Inc. Elysian, MN).

[00215] O perfil de óleo para todas as sementes são revisados para níveis elevados de ácido oleico (18:1), como uma confirmação do fenótipo. O nível de ácido oleico mensurado por GC é esperado que seja > 70% para as sementes de soja DP-305423-1, e < 30% para as sementes controle.

[00216] As plantas são examinadas pela análise com *Southern blot* para confirmar a presença do gene *gm-fad2-1* introduzido e do gene *gm-hra* nas plantas e soja DP-305423-1, sua ausência nas plantas de soja controle, e estes dados são correlacionados com os resultados de ácido oleico.

EXEMPLO 5

CARACTERIZAÇÃO DA SEQUÊNCIA INSERIDA E DA BORDA DE FLAQUEAMENTO DA SOJA EVENTO DP-305423-1

[00217] As regiões de inserção e da borda flanqueada do DNA genômico do DP-305423-1 foram isoladas por PCR e por clonagem em cosmídeos. Fragmentos da PCR foram sequenciados, diretamente ou clonados em vetores plasmidiais antes do sequenciamento. DNAs de cosmídeos foram isolados e sequenciados.

[00218] Cópias parciais e intactas de PHP19340A e uma única cópia de PHP17752A foram encontradas por estarem presentes em quatro *contigs* de DNA genômico do evento DP-305423-1. Estes quatro *contigs* foram designados Contig-1 (Figura 9; SEQ ID NO: 5), Contig-2 (Figura 10; SEQ ID NO: 6), Contig-3 (Figura 11; SEQ ID NO: 7) e Contig-4 (Figura 12; SEQ ID NO: 82). Contig-1 tem 39.499 nucleotídeos. A sequência genômica 5' da soja é a partir do nucleotídeo 1-18.651; a sequência de inserção é a partir do nucleotídeo 18652-31579; e a sequência genômica 3' é a partir do nucleotídeo 31580-39499. Contig-2 tem 25.843 nucleotídeos. A sequência genômica 5' da soja é a partir do nucleotídeo 1-12.163; a sequência de inserção é a partir do nucleotídeo 12164-14494; e a sequência genômica 3' é a partir do nucleotídeo 14495-25843. Contig-3 tem 12.465 nucleotídeos. A sequência genômica 5' da soja é a partir do nucleotídeo 1-5.750; a sequência de inserção é a partir do nucleotídeo 5751-7813, e a sequência genômica 3' é a partir do nucleotídeo 7814-12465. Contig-4 tem 10.058 nucleotídeos. A sequência genômica 5' da soja é a partir do nucleotídeo 1-2899; a sequência de inserção é a partir do

nucleotídeo 2899-7909; e a sequência genômica 3' é a partir do nucleotídeo 7910-10.058.

A CLONAGEM DO DNA GENÔMICO E O DESENVOLVIMENTO DO PRIMER

[00219] O DNA genômico total do DP-305423-1 da soja foi parcialmente digerido com enzimas restrição *Hind III* e *Mbo I* e foram clonados em vetores cosmídeos para construir bibliotecas de cosmídeos *Hind III* e *Mbo I*. As bibliotecas de cosmídeos foram rastreadas usando um fragmento promotor KT13 como sonda. Um total de três clones únicos (51-21, 51-9, e H3IIBB19) foi identificado a partir da biblioteca *Hind III* e dois clones (mbo30 e mbo22) a partir da biblioteca *Mbo I*. Estes cinco clones foram analisados por sequenciamento de inserção total (FIS), um método de sub-clonagem baseado em transposon para facilitar o sequenciamento bidirecional do clone inserido a partir do sítio do evento de transposição (MJ Research TGS sistema; Happa et al. De 1999). A análise da sequência revelou que 51-21 e mbo30 eram clones sobrepostos contendo a inserção idêntica do Contig-1, 51-9 e mbo22 eram clones sobrepostos contendo a inserção idêntica do Contig-2, e H3IIBB19 continha um único Contig-3. Os *primers* foram desenhados com base nas sequências dos clones cosmídeos. O PCR genômico foi realizado para verificar as regiões de inserções e bordas de flanqueamento no DP-305423-1 da soja.

CONTIG-1 - REGIÕES DE INSERÇÕES E BORDA DE FLANQUEAMENTO GENÔMICA:

[00220] Os *primers* foram desenhados com base na sequência de informações obtidas a partir dos clones cosmídeos 51-21 e mbo30 contendo sequência do Contig-1. Os produtos de PCR foram amplificados a partir do DNA genômico da soja DP-305423-1 utilizando o par de *primers* A (06-O-1571/06-O-1572, 7103 pb, da borda de junção genômica/inserida 5'), B (06-O-1351 / 06-O-1367, 731 pb, da borda de junção genômica/inserida 5'), C (06-O-1357/06-O-1368, 3226 pb da inserida), D (06-O-1357/06-O- 1369, 2737 pb da inserida), E (06-O-1356/06-O-1371, 1800 pb inserida), F (06-O-1360/06-O-

1423, 1321 pb inserida), G (06-O-1363/06-O-06-0-1369, 1830 pb inserida), H (06-O-1421/06-O-06-0-1367, 2410 pb inserida), e I (06 -O-1577/06-O-1578, 2991 pb, da borda de junção genômica/inserida 3') (Tabela 13), e então clonados. Os produtos da PCR: B, C, D, E, F, G e H foram sequenciados diretamente para verificar a inserção, e A e I foram analisados por FIS para verificar 5 'e 3' as junções genômicas/inserida e suas regiões da borda de flanqueamento. Nenhum produto de PCR foi amplificado quando o DNA genômico controle foi usado como modelo.

[00221] Para Contig-1, 22.452 bp da sequência genômica DP-305423-1 foi confirmada (nucleotídeos 11652-34103 SEQ ID NO: 5), compreendendo 7.000 pb da sequência da borda de flanqueamento 5', 2524 pb da sequência da borda de flanqueamento genômica, e 12.928 bp do DNA inserido. A inserção foi encontrada para conter um fragmento intacto PHP19340A, um único, fragmento intacto PHP17752A e três fragmentos PHP19340A truncados. O primeiro fragmento PHP19340A truncado contém um terminador parcial KTi3 (180 pb), com deleção 3', uma fragmento intacto *gm-fad2-1* (597 pb) e um promotor KTi3 intacto (2084 pb). O segundo fragmento truncado PHP19340A contém um fragmento parcial *gm-fad2-1* (39 pb), com deleção 3' e um promotor KTi3 intacto (2084 pb). O terceiro fragmento truncado PHP19340A contém um promotor KTi3 parcial (245 pb), com deleção 5' e um fragmento *gm-1-fad2* parcial (186 pb), com deleção 3'.

[00222] Para demonstrar que a sequência da borda de flanqueamento 5' e 3' identificadas para Contig-1 são de origem da soja, a PCR foi realizada nas da regiões da borda de flanqueamento 5 'e 3' (07-O-1889/07-O-1940, 07 -- O-1892/07-O-1894, respectivamente) em ambos DNA genômico da soja das amostras PD-305423-1 e amostras controle. Os produtos da PCR esperados (115 pb para a região genômica da borda de flanqueamento 5' e 278 pb para a região genômica da borda de flanqueamento 3') foram gerados a

partir de ambas amostras de soja, DP-305423-1 e controle, indicando que as sequências genômicas eram de origem da soja e não específicas para a soja DP-305423-1. Estes produtos PCR foram clonados e sequenciados. As sequências, do DNA genômico tanto da DP-305423-1 quanto do controle foram idênticas.

CONTIG-2 - REGIÕES DE INSERÇÕES E BORDA DE FLANQUEAMENTO GENÔMICA:

[00223] Os *primers* foram desenhados com base em informações das sequências obtidas a partir dos clones cosmídiais 51-9 e mbo22 para Contig-2. Os produtos de PCR foram amplificados a partir de DNA genômico da DP-305423-1 de soja utilizando os pares primers J (06-O-1588/06-O-1585, 7642 pb, da borda de junção genômica/inserida 5'), K (06-O-1586 / 06-O-1403, 2807 pb, da borda de junção genômica/inserida 5'), e L (06-O-1404/06-O-1592, 2845 pb, da borda de junção genômica/inserida 3') (Tabela 13), e então clonados. Os produtos da PCR: K e L foram sequenciados diretamente para verificar a inserção e a junção genômica/inserida 3' e sua região da borda de flanqueamento, e J foi analisado por FIS para verificar a inserção e a junção genômica/inserida 5' e sua região da borda de flanqueamento. Nenhum produto de PCR foi amplificado quando o DNA genômico controle foi usado como modelo.

[00224] Para Contig-2, 12667 bp da sequência genômica do DP-305423-1 foi confirmada (nucleotídeos 4565-17231, SEQ ID NO: 6), compreendendo 7599 pb da sequência da borda de flanqueamento 5', 2737 pb da sequência da borda de flanqueamento 3' e 2331 bp do DNA inserido. A inserção foi encontrada para conter um fragmento PHP19340A truncado com um promotor KTi3 parcial (1511 pb), um fragmento *gm-fad2-1* intacto (597 pb), e um terminador KTi3 intacto (196 pb).

[00225] Para demonstrar que a sequência da borda de flanqueamento 5' e 3' identificadas para Contig-2 são de origem da soja, a PCR

foi realizada nas da regiões da borda de flanqueamento 5' e 3' (os pares de *primer* 07-O-1895/07-O-1898 e 07-O-1905/07-O-1903, respectivamente) em ambos DNA genômico da soja das amostras PD-305423-1 e amostras controle. Os produtos da PCR esperados (278 pb para a região genômica da borda de flanqueamento 5' e 271 pb para a região genômica da borda de flanqueamento 3') foram gerados a partir de ambas amostras de soja, DP-305423-1 e controle, indicando que as sequências genômicas eram de origem da soja e não específicas para a soja DP-305423-1. Estes produtos PCR foram clonados e sequenciados. As sequências, do DNA genômico tanto da DP-305423-1 quanto do controle foram idênticas.

CONTIG-3 - REGIÕES DE INSERÇÕES E BORDA DE FLANQUEAMENTO GENÔMICA

[00226] Os primers foram desenhados com base em informações das sequências obtidas a partir dos clones cosmídiais H3IIB19 para o Contig-3. Os produtos de PCR foram amplificados a partir de DNA genômico da DP-305423-1 de soja utilizando os pares primers M (06-O-1669/06-O-1426, 2804 pb), N (06-O-1355/06-O-1459, 1335 pb), O (06-O-1569/06-O-1551, 1085 pb), e P (05-O-1182/06-O-1672, 2614 pb) (Tabela 13), e então clonados. Os produtos da PCR M, N, O e P foram sequenciados diretamente para verificar a inserção e a junção genômica/inserida 3' e sua região da borda de flanqueamento. Nenhum produto de PCR foi amplificado quando o DNA genômico controle foi usado como modelo.

[00227] Para Contig-3, 6789 pb da sequência genômica do DP-305423-1 foi confirmada (nucleotídeos 3312-10100, SEQ ID NO: 7), compreendendo 2439 pb da sequência da borda de flanqueamento 5', 2287 pb da sequência da borda de flanqueamento 3', e 2063 bp do DNA inserido. A inserção foi encontrada para conter um fragmento PHP19340A truncado com apenas um promotor KTi3 parcial (1550 pb), um fragmento de 495 bp da cadeia principal do plasmídeo. Este fragmento da cadeia principal do plasmídeo foi

idêntico ao das regiões situadas a partir de 2033 pb a 2527 pb no plasmídeo PHP19340 e de 1836 bp a 2330 pb no plasmídeo PHP17752, não incluindo a origem de replicação (*ori*). O *ori* nos plasmídeos PHP13940 e PHP1772 está localizado a partir do 1561 pb a 1930 pb e 1364 pb a 1733 pb, respectivamente (TOMIZAWA *et al.*, 1977).

[00228] Para demonstrar que a sequência da borda de flanqueamento 5' e 3' identificadas para Contig-3 são de origem da soja, a PCR foi realizada nas da regiões da borda de flanqueamento 5 'e 3' (pares de *primers* 07-O-1881/07-O-1882 e 07-O-1886/07-O-1884, respectivamente) em ambos DNA genômico da soja das amostras PD-305423-1 e amostras controle. Os produtos da PCR esperados (262 pb para a região genômica da borda de flanqueamento 5' e 280 pb para a região genômica da borda de flanqueamento 3') foram gerados a partir de ambas amostras de soja, DP-305423-1 e controle, indicando que as sequências genômicas eram de origem da soja e não específicas para a soja DP-305423-1. Estes produtos PCR foram clonados e sequenciados. As sequências, do DNA genômico tanto da DP-305423-1 quanto do controle foram idênticas.

CONTIG-4 - REGIÕES DE INSERÇÕES E BORDA DE FLANQUEAMENTO GENÔMICA

[00229] Bibliotecas de plasmídeos e iPCR foram utilizadas para identificar a inserção e as regiões da borda de flanqueamento do Contig-4. O DNA genômico total da soja DP-305423-1 digerido com enzimas de restrição *Spe* I e *Bcl* I, e corrido em gel de agarose para separar os fragmentos de DNA com base em seus pesos moleculares. Os fragmentos de DNA nos géis de agarose foram transferidos para a membrana nylon e hibridizados com uma sonda *gm-fad2-1* ou sonda para o promotor KT13. As bandas de 2,8 kb e 5,1 kb foram hibridizadas com a sonda *gm-fad2-1* após a digestão com *Spe* I, e as bandas de 1,5 kb e 3,3 kb foram hibridizadas com a sonda para o promotor KT13 após a digestão com *Bcl* I. Todas estas bandas só estavam presentes nas

plantas DP-305423-1, mas ausentes nas plantas controle. Essas quatro bandas foram clonadas em vetores plasmídiais para produzir uma biblioteca de plasmídeos. Clones positivos foram identificados após a seleção da biblioteca de plasmídeos com a sonda *gm-fad2-1* ou sonda para o promotor KTi3, e foram sequenciadas diretamente. A sequência de Contig-4 é demonstrada na SEQ ID NO: 82.

[00230] A banda de 2,8 kb a partir da digestão com *SpeI* e a banda de 3,3 kb a partir da digestão com *BclI* foram sobrepostas (referido como *SpeI*2.8), contendo um fragmento PHP19340A truncado com deleção de 159 pb na extremidade 3' do promotor KTi3; e a banda 5,1 a partir da digestão com *SpeI* e a banda de 1,5 kb a partir da digestão com *ScI* foram sobrepostas (referido como *SpeI*5.1), contendo um fragmento PHP19340A truncado com deleção de 649 pb na extremidade 3' do promotor KTi3. Dado que existe um sítio para *SpeI* dentro do terminador KTi3, apenas 148 pb da sequência do terminador KTi3 foi obtida tanto para *SpeI*2.8 quanto para *SpeI*5.1.

[00231] Com base nas informações das sequências, os primers desenhados para a PCR inversa (iPCR), foram usados para se obter informações adicionais das sequência na extremidade 3' do terminador KTi3. Os produtos da iPCR foram sequenciados, tanto diretamente, ou então clonados e depois sequenciados. Os dados das sequências gerados a partir dos produtos da iPCR com a digestão *NdeI* demonstraram que *SpeI*2.8 continha um terminador KTi3 intacto e um terminador KTi3 de 35 pb na orientação inversa, e *SpeI*5.1 continha um terminador KTi3 intacto e um terminador KTi3 de 34 pb na orientação inversa, indicando que os dois terminadores KTi3 do *SpeI*2.8 e *SpeI*5.1 estavam dispostos como repetições invertidas. Os dados da sequência gerados a partir de produtos da iPCR com a digestão de *PacI* confirmaram que *SpeI*2.8 e *SpeI*5.1 estão dispostos como repetições invertidas.

[00232] Uma confirmação adicional foi realizada usando a análise de *Southern blot*. O DNA genômico total da DP-305423-1 e das plantas controle foram digeridos com *BclI*, *Clal* e *XmnI*, e corrido em gel de agarose, transferidos para a membrana nylon e hibridizados com a sonda *gm-fad2-1*. As bandas de tamanhos previstos foram hibridizadas com a sonda *gm-fad2-1*: bandas de cerca de 3,1 kb pela digestão com *BclI*, cerca de 3,9 kb pela digestão com *Clal*, e 1,7 kb pela digestão com *XmnI* (Figura 12). Em conjunto, estes resultados sugerem que os dois terminadores KTi3 da Spel2.8 e Spel5.1 estão dispostos em forma invertida.

[00233] Para Contig-4, 10.058 bp do DP-305423-1 sequência genômica foi identificado (SEQ ID NO: 82), compreendendo 2899 pb da sequência da borda de flanqueamento 5', 2149 pb da sequência da borda de flanqueamento 3', e 5010 bp do DNA inserido. Acredita-se que a inserção contenha dois fragmentos PHP19340A truncados de maneira invertida. O primeiro fragmento PHP1930A truncado está localizado a 2900-5163 pb, contendo um promotor KTi3 parcial (1442 pb), com deleção 5' em um fragmento *gm-fad2-1* intacto (597 pb) e um terminador KTi3 intacto (196 pb). O segundo fragmento PHP1930A truncado está localizado a 5164-7919 pb, contendo um promotor KTi3 parcial (1934 pb), com deleção 5' em um fragmento *gm-fad2-1* intacto (597 pb) e um terminador KTi3 intacto (196 pb) (Figura 12).

[00234] Para verificar a junção genômica/inserida 5' e 3' obtida a partir de cruzamentos das bibliotecas de plasmídeo, uma PCR foi realizada no DNA genômico das plantas DP-305423-1 de soja utilizando o par de *primers* Q (HOS-A/HOS-B) para confirmar a junção genômica/inserida 5', e o par de *primers* R (HOS-C/HOS-D) para confirmar a junção genômica/inserida 3'. Os produtos de PCR esperados foram amplificados a partir das plantas DP-305423-1 (Tabela 13), e não foram amplificados a partir de plantas controle,

esses produtos da PCR foram clonados e sequenciados. A sequência foi confirmada para ser a mesma sequência que as obtidas a partir de clones plasmídeos.

TABELA 13

PCR GENÔMICO PARA CONFIRMAR O DNA INSERIDO E AS REGIÕES DA BORDA DE

FLANQUEAMENTO NA SOJA DP-305423-1

Produto da PCR (tamanho em pb)	Par de <i>Primers</i>	Sistema de PCR¹	Inserido	Região amplificada
A (7103)	06-O-1571/06-O-1572	<i>Expand Long Template</i>		Região de flaqueamento 5' e inserção
B (731)	06-O-1351/06-O-1367	Alta fidelidade		Região de flaqueamento 5' e inserção
C (3226)	06-O-1357/06-O-1368	Advantage-GC-2		Inserção
D (2737)	06-O-1357/06-O-1369	Advantage-GC-2		Inserção
E (1800)	06-O-1356/06-O-1371	Alta fidelidade		Inserção
F (1321)	06-O-1360/06-O-1423	Advantage-GC-2		Inserção
G (1830)	06-O-1363/06-O-1369	Advantage-GC-2		Inserção
H (2410)	06-O-1421/06-O-1367	Advantage-GC-2		Inserção
I (2991)	06-O-1577/06-O-1578	Extensor de alta fidelidade		Região de flaqueamento 3' e inserção
J (7642)	06-O-1588/06-O-1585	<i>Expand Long Template</i>	2	Região de flaqueamento 5' e inserção

Produto da PCR (tamanho em pb)	Par de <i>Primers</i>	Sistema de PCR¹	Inserido	Região amplificada
K (2817)	06-O-1586/06-O-1403	Advantage-GC-2	2	Região de flaqueamento 5' e inserção
L (2845)	06-O-1404/06-O-1592	Advantage-GC-2	2	Região de flaqueamento 3' e inserção
M (2804)	06-O-1669/06-O-1426	<i>Expand Long Template</i>	3	Região de flaqueamento 5' e inserção
N (1335)	06-O-1355/06-O-1459	Alta fidelidade	3	Inserção
O(1085)	06-O-1569/06-O-1551	<i>Expand Long Template</i>	3	Região de flaqueamento 3' e inserção
P (2614)	05-O-1182/06-O-1672	Alta fidelidade	3	Região de flaqueamento 3' e inserção
Q (209)	HOS-A/HOS-B	Tag polimerase	4	Região de flaqueamento 5' e inserção
R (222)	HOS-C/HOS-D	Tag polimerase	4	Região de flaqueamento 3' e inserção

¹. Os sistemas de PCR de alta fidelidade e *Expand Long Template* foram adquiridos da Roche (Mannheim, Alemanha), o sistema de PCR Advantage-GC-2 foi comprado da Clontech (Palo Alto, CA), o sistema de PCR Extensor de alta fidelidade foi comprado da ABgene (Surrey , Reino Unido), e as taqs

polimerase foram compradas da Fermentas (Hanover, MD).

EXEMPLO 6

ESTABILIDADE DA INSERÇÃO CONTIG-1

[00235] A inserção no Contig-1 foi encontrada contendo um fragmento PHP19340A intacto (cassete de supressão *gm-fad2-1*), uma único, fragmento PHP17752A intacto (cassete de expressão *gm-hra*), e três fragmentos PHP19340A truncados. A análise por *Southern blot* realizada em 100 plantas da geração F2 do DP-305423-1 identificou uma única planta que parecia ter sofrido um evento de recombinação que resultou na retirada de todo o cassete *gm-hra* com porções de dois de vários fragmentos do promotor KTi3 encontrados na inserção. Um grande número de plantas a partir de gerações segregantes foram analisadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para determinar em qual frequência esta recombinação ocorre.

[00236] As sementes foram obtidas a partir de gerações segregantes da soja DP-305423-1: BC1F2, BC2F2 e BC3F2. Cada geração consistia de DP-305423-1 quer seja na origem Elite 1 ou Elite 2. Um total de 1060 sementes foram plantadas (Tabela 14).

TABELA 14

SEMENTES DA SOJA DP-305423-1

Geração	Origem	Sementes plantadas	Plantas Amostradas
BC1F2	Elite 1	175	166
BC1F2	Elite 2	150	142
BC2F2	Elite 1	65	62
BC2F2	Elite 2	40	36
BC3F2	Elite 1	420	402
BC3F2	Elite 2	210	201

[00237] Perfurações de uma única folha foram coletadas de plantas e o DNA genômico foi extraído das perfurações utilizando um método

de extração em hidróxido de sódio quente e tris (Truett, G.E., Heeger, P., Mynatt, R.L., Truett, A.A., Walker, J.A. e Warman, M.L. (2000) *Preparation of PCR-Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT)*. *BioTechniques* 29: 52-53.).

[00238] Um PCR em tempo real foi realizado em cada amostra de DNA utilizando um sistema de detecção de sequência ABI PRISM® 7900HT e acompanhado pelo *software* SDS (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). A sonda TaqMan® e o conjunto de *primers* foram concebidos para detectar as duas sequências da inserção alvo: (1), a região de junção 5' entre o DNA genômico e o DNA inserido no Contig-1, que foi utilizado como um marcador para o cassete de supressão *gm-fad2-1* (SEQ ID NOs: 89, 90 e 91), e (2) a região da inserção do Contig-1 abrangendo o promotor SAMS e *gm-hra* (SEQ ID NOs: 92, 93 e 94). Além disso, uma sonda TaqMan® e um conjunto de *primers* para um gene endógeno de referência da soja foi utilizado para confirmar a presença de DNA amplificável em cada reação. A análise consistiu da determinação por PCR quantitativo em tempo real dos chamados positivo / negativo qualitativos. O DNA extraído foi testado usando um *primer* otimizado e validado e concentrações de sonda na mistura para PCR *Extract-N-Amp*® contendo um corante Rox como marcador passivo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Após a incubação inicial a 50°C durante 2 minutos e, em seguida, a 95°C durante 3 minutos, 40 ciclos foram realizados como segue: 95°C durante 15 segundos, 60°C por 1 minuto. A determinação positiva ou negativa para cada inserção alvo foi baseada na comparação do C_T (ciclo limiar) da inserção alvo da PCR para o marcador endógeno.

[00239] Um total de 1009 plantas de três gerações segregantes diferentes (BC1F2, BC2F2 e BC3F2) e duas origens diferentes (Elite 1 e Elite 2) foram analisadas por PCR em tempo real qualitativo para junção 5' Contig-1 e o promotor SAMS: :alvos *gm-hra*. Cada reação continha DNA amplificável

baseada no controle do gene endógeno. Das 1009 plantas nas seis populações segregantes, 745 foram positivas e 264 foram negativas para ambos os ensaios de PCR. Não foram identificadas plantas em que os resultados da PCR fossem positivos para um alvo e negativas para outros. Consequentemente, neste grupo de amostras de 1009 plantas, nenhuma recombinação na inserção Contig-1 que removeu seletivamente o cassete promotor SAMS: *gm-hra* foi detectado. Um resumo dos resultados é fornecido na Tabela 15.

TABELA 15

RESULTADOS DA ANÁLISE POR PCR EM TEMPO REAL QUALITATIVO DAS GERAÇÕES

E DAS ORIGENS

Geração	Origem	Resultados da PCR Contig-1 Junção 5'		Resultados da PCR promotor SAMS:: <i>gm-hra</i>		Total de Plantas
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
BC1F2	Elite 1	125	41	125	41	166
	Elite 2	108	34	108	34	142
BC2F2	Elite 1	39	23	39	23	62
	Elite 2	27	9	27	9	36
BC3F2	Elite 1	297	105	297	105	402
	Elite 2	149	52	149	52	201
Total		745	264	745	264	1009

EXEMPLO 7

NÍVEIS DE ÁCIDOS GRAXOS NO GRÃO DE SOJA

[00240] Os níveis de 25 ácidos graxos foram mensurados no grão da soja PD-305423-1 e soja controle. Os níveis de dez ácidos graxos ficaram abaixo do limite inferior de quantificação (LLOQ) para o ensaio: ácido caprílico

(C8:0), ácido cáprico (C10:0), ácido láurico (C12:0), ácido miristoleico (C14:1), ácido pentadecanóico (C15:0), ácido pentadecenóico (C15:1), ácido γ -linolênico (C18:3), ácido eicosatrienóico (C20:3), ácido araquidônico (C20:4) e ácido erúcico (C22:1). Por conseguinte, não foram realizadas análises estatísticas sobre estes ácidos graxos e os dados não são apresentados. OS resultados da análise para os 15 ácidos graxos restantes são apresentados na Tabela 16.

[00241] Os valores médios para o ácido oleico (C18:1) e ácido linoleico (C18:2) caiu fora do intervalo de tolerância e/ou a literatura combinada varia entre as variedades de soja convencionais. Como esperado, o nível médio de ácido oleico na soja DP-305423-1 foi superior aos valores de ambos os intervalos de tolerância estatística tanto as linhagens de soja de referência quanto para a faixa da literatura para as variedades de soja convencional. A diferença média do nível do ácido oleico nas sojas DP-305423-1 foi estatisticamente significativa na isolinhagem de soja controle (ajustado o valor de $P < 0,05$). A média do nível de ácido linoleico (C18:2) na soja DP-305423-1 foi inferior a faixa do intervalo de tolerância estatística para as linhagens de soja de referência e a faixa da literatura para variedades de soja convencionais. A diferença também foi estatisticamente significativa da isolinhagem de soja controle (valor de p ajustado $< 0,05$). O aumento do teor de ácido oleico e de diminuição do teor de ácido linoleico na soja DP-305423-1 são efeitos pretendidos alcançados através da introdução do fragmento do gene *gm-fad2-1*. Estas alterações foram previamente reportadas na soja transgênica de alta concentração oleica (OCDE identificador DD-Ø26ØØ5-3, base de dados AGBIOS) gerados pela introdução do gene *FAD2-1* (Kinney e Knowlton, 1997; Glanceyefa 1998; Knowlton, 1999).

[00242] Apesar de estar dentro dos intervalos literatura e/ou intervalos de tolerância estatísticos, os valores médios para o ácido palmítico

(C16:0) e ácido linolênico (C18:3) apresentaram diferenças estatisticamente significante (mais baixos) na soja DP-305423-1, em comparação com a isolinhagem de soja controle (valor de p ajustado $< 0,05$). O ácido linolênico é produzido diretamente a partir de conversão do ácido linoleico e, conseqüentemente, com a diminuição do teor de ácido linoleico era esperado que o teor de ácido linolênico na soja DP-305423-1 fosse afetado.

[00243] A diminuição no teor de ambos os ácidos palmítico e linolênico foi relatado anteriormente na soja transgênica de alto teor oleico (OCDE identificador DD-Ø26ØØ5-3, base de dados AGBIOS) gerados pela introdução do gene *FAD2-1* (Kinney e Knowlton, 1997; Glancey *et al* ., 1998; Knowlton, 1999).

[00244] O (9,15) isômero do ácido linoleico (ácido cis-9, cis-15-octadecadienoico) foi detectado na soja PD-305423-1 na concentração média de 0,341% do total de ácidos graxos, enquanto que nas variedades convencionais não há referência de concentrações mensuráveis deste analito. Este foi um achado esperado, pelo fato do isômero ácido 9,15-linoleico ter sido observado anteriormente em sojas de alto teor oleico a menos de 1% do total de ácidos graxos (Kinney e Knowlton, 1997). Este isômero é também encontrado em concentrações variando de 0,02% a 5,4% dos ácidos graxos totais, em muitas fontes comestível de gorduras, incluindo gorduras de manteigas, queijos, sebo de carneiro, óleo vegetal parcialmente hidrogenado, leite humano e polpa de manga (Kinney e Knowlton, 1997, e as referências deste). O isômero ácido 9,15-linoleico é provavelmente um resultado da atividade dos ácidos graxos desaturase codificada pelo gene *FAD3* que normalmente insere uma dupla ligação d-15 no ácido 9,15-linoleico para produzir o ácido 9, 12, 15-linolênico. No soja DP-305423-1, o teor de ácido 9,12-linoleico é significativamente menor (Tabela 16) de forma que o gene *FAD3* que codifica a desaturase provavelmente cria uma pequena quantidade de isômero ácido 9,15-

linoleico por desnaturação do substrato ácido 9-oleico na posição d-15. Esta opinião é corroborada pelos resultados do cruzamento de sojas com alto teor oleico (OCDE identificador DD-Ø26ØØ5-3, AGBIOS) com sojas que contém um gene *FAD3* silenciado. Na progênie resultante o isômero ácido 9,15-linoleico é reduzido ou eliminado (Kinney e Knowlton, 1997).

[00245] Os valores médios dos dois ácidos graxos menores, ácido heptadecanoico (C17:0) e ácido heptadecenoico (C17:1), na soja DP-305423-1 foram superiores ao intervalo de tolerância estatística para os valores das variedades de soja convencionais na literatura. Os valores médios de C17:0 e C17:1 tiveram diferenças estatisticamente significante com as isolinhagens de soja controle. No entanto, os níveis de ácido heptadecanoico e heptadecenoico são, em geral, ainda muito baixo, cada um representa menos de 1,2% do total de ácidos graxos na soja PD-305423-1.

[00246] O aumento detectado no ácido heptadecanoico (C17:0) e ácido heptadecenoico (C17:1), na soja DP-305423-1 não foi inesperado, pois a expressão da proteína *gm-hra* resulta similarmente em uma ligeira mudança na disponibilidade do substrato da enzima *gm-hra*, piruvato e 2-cetobutirato. Estes dois compostos também são substratos para o complexo enzimático que desencadeia a biossíntese do óleo.

[00247] Os valores médios de ácido mirístico (C14:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18: 0), ácido araquídico (C20:0), ácido eicosenoico (C20:1), ácido beênico (C22:0) e ácido lignocérico (C24:0) para a soja DP-305423-1 estavam dentro dos intervalos de tolerância estatísticas e/ou valores na literatura combinada para esses ácidos graxos em diferentes variedades de soja. Com exceção do ácido beênico, os valores médios para esses ácidos graxos apresentaram diferenças estatisticamente significantes, quer para cima (ácidos palmitoleico, araquídico, eicosenoico e lignocérico) ou para baixo (ácidos mirístico e esteárico) daqueles encontrados em isolinhagens

controle. Os ácidos mirístico, palmitoleico, araquídico, eicosenoico, beênico e lignocérico são ácidos graxos menores, contendo cada um 0,05 - 0,5% do total de ácidos graxos na soja DP-305423-1, o ácido esteárico compreende menos que 4,5% na soja DP-305423-1. Estes ácidos graxos são constituintes comuns de óleos vegetais e comuns em alimentos e estão presentes em níveis semelhantes aos observados na soja PD-305423-1 (*USDA Nutrition Database*, Versão 19).

[00248] O ácido eicosadienoico (C20:2) foi indetectável na soja PD-305423-1. De maneira similar, uma variedade de soja de referência também carece de concentrações mensuráveis deste ácido graxo. Um nível muito baixo de ácido eicosadienoico foi detectável na isolinhagem controle, entretanto, essa diferença com a soja DP-305423-1 não foi estatisticamente significativa (Valor de P ajustado > 0,05).

TABELA 16

PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS NO GRÃO DE SOJA

Ácidos Graxos (% Total)		Controle (Segregante Nulo)	Soja 305423	Intervalo de Tolerância ¹	Valores da literatura combinada ²
Ácido Mirístico (C14:0)	Média ¹⁵	0,0742	0,0451	0-0,174	0.0710-0.238
	Intervalo ⁴	0,0676 -0,0807	0,0419- 0,0522		
	Valor de P ajustado ⁵		0,0007 ⁷		
	Valor P ⁶		0,0001		
Ácido palmitico (C16: 0)	Média	10,3	6,28	2,93-19,6	7.00-15.8
	Intervalo	9,77-10,7	5,71 -7,27		
	Valor de P ajustado		0,0007 ⁷		

Ácidos Graxos (% Total)		Controle (Segregante Nulo)	Soja 305423	Intervalo de Tolerância ¹	Valores da literatura combinada ²
	<i>Valor P</i>		0,0001		
Ácido Palmitolêico (C16:1)	Média	0,0860	0,0946	0,0110-0,177	0.0860 - 0.194
	Intervalo	0,0751 -0,0948	0,0835 - 0,105		
	Valor de P ajustado		0,0248 ⁷		
	<i>Valor P</i>		0,0053		
Ácido Heptadecanóic o (C17:0)	Média	0,113	0,798	0,0722 - 0,131	0.0850 - 0.146
	Intervalo	0,0993 -0,127	0,703 - 0,890		
	Valor de P ajustado		0,0007 ⁷		
	<i>Valor P</i>		0,0001		
Ácido Heptadecenico (C17:1)	Média	0,0614	1,19	0,0351 - 0,0732	0.0730 - 0.0870
	Intervalo	0,0513-0,0762	1,01 -1,51		
	Valor de P ajustado		0,0007 ⁷		
	<i>Valor P</i>		0,0001		
Ácido esteárico (C18:0)	Média	4,98	4,36	0,852 - 8,34	2.00-5.88
	Intervalo	4,36-5,89	3,90-5,01		

Ácidos Graxos (% Total)		Controle (Segregante Nulo)	Soja 305423	Intervalo de Tolerância ¹	Valores da literatura combinada ²
	Valor de P ajustado		0,0007 ⁷		
	<i>Valor P</i>		0,0001		
Ácido Oleico (C18:1)	Média	21,1	76,5	11,3-32,6	14.3-34.0
	Intervalo	18,0-24,1	68,7-79,4		
	Valor de P ajustado		0,0007 ⁷		
	<i>Valor P</i>		0,0001		
Ácido Linoleico (C18:2)	Média	52,5	3,62	41,7-64,3	42.3-60.0
	Intervalo	50,2 - 54,3	1,53-8,98		
	Valor de P ajustado		0,0007 ⁷		
	<i>Valor P</i>		0,0001		
Ácido Linoleico (C18:2) Isômero (9,15)	Média	0,247	0,341	NA ⁸	NR ⁹
	Intervalo	0 - 0,532	0,143- 0,456		
	Valor de P ajustado		0,1787		
	<i>Valor P</i>		0,0699		
Ácido Linolênico (C18:3)	Média	9,35	5,39	1,15-14,7	2.00-12.5
	Intervalo	7,83-11,2	4,03-7,32		

Ácidos Graxos (% Total)		Controle (Segregante Nulo)	Soja 305423	Intervalo de Tolerância ¹	Valores da literatura combinada ²
	Valor de P ajustado		0,0007 ⁷		
	<i>Valor P</i>		0,0001		
Ácido araquidico(C2 0:0)	Média	0,396	0,450	0,103-0,619	0-1.00
	Intervalo	0,348 -0,479	0,393 - 0,528		
	Valor de P ajustado		0,0007 ⁷		
	<i>Valor P</i>		0,0001		
Ácido Eicosenóico (C20:1)	Média	0,170	0,347	0,0549 - 0,319	0.140-0.350
	Intervalo	0,135-0,201	0,290 - 0,394		
	Valor de P ajustado		0,0007 ⁷		
	<i>Valor P</i>		0,0001		
Ácido Eicosadienóic o (C20:2)	Média	0,0225	0	NA ⁸	0.0770 - 0.245
	Intervalo	0 - 0,0502	0-0		
	Valor de P ajustado		0,0928		
	<i>Valor P</i>		0,0298		
Ácido Beênico	Média	0,414	0,427	0,188-0,458	0.277-0.595

Ácidos Graxos (% Total)		Controle (Segregante Nulo)	Soja 305423	Intervalo de Tolerância ¹	Valores da literatura combinada ²
(C22:0)	Intervalo	0,349 -0,566	0,382 - 0,546		
	Valor de P ajustado		0,5468		
	<i>Valor P</i>		0,3779		
Ácido Linocérico (C24:0)	Média	0,114	0,143	0-0,310	NR ⁹
	Intervalo	0,0845 -0,139	0,115- 0,173		
	Valor de P ajustado		0,0017 ⁷		
	<i>Valor P</i>		0,0003		

¹ Limite de tolerância negativa foi definido para zero.

² Intervalo da literatura foram retirados a partir da literatura publicada para a soja (OCDE, 2001; ILSI 2004).

³ Média dos mínimos quadrados.

⁴ Intervalo denota o menor e o maior valor individual em todos locais.

⁵ Razão de falsas descobertas (FDR) ajustado ao valor de P

⁶ não ajustado ao valor de P

⁷ Diferença estatisticamente significativa; valor de P ajustado <0,05

⁸ A análise estatística não disponível (ND), devido à falta de concentrações mensuráveis detectadas neste analito.

⁹ Intervalos dos analitos não foram relatados (NR) na literatura de referência.

[00249] O artigo "a" e "um" são utilizados no presente para se referir a um ou mais de um (ou seja, pelo menos um) objeto gramatical do

artigo. A título de exemplo, "um elemento" pode significar um ou mais elementos.

[00250] Todas as publicações e os pedidos de patentes mencionadas na descrição são indicativos do nível dos técnicos hábeis no assunto ao qual pertence a presente invenção. Todas as publicações e os pedidos de patentes são incorporados ao presente pela referência à mesma medida, como se cada publicação ou pedido de patente foi especificamente e individualmente indicado por estar incorporado ao presente pela referência.

[00251] Apesar de a invenção precedente ter sido descrita em detalhes a título de ilustração e exemplos foram utilizados para fins de entendimento, será evidente que algumas modificações e alterações possam ser praticadas no escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. POLINULEOTÍDEO ISOLADO, caracterizado pelo fato de que compreende as SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 84, 85, 86, 87 ou 88, ou complemento destas.

2. MÉTODO PARA IDENTIFICAR SE UMA AMOSTRA BIOLÓGICA COMPREENDE UM POLINUCLEOTÍDEO, que compreende uma das SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) contactar a mencionada amostra biológica com um primeiro e um segundo *primer* em que o primeiro *primer* anela a

(i) uma região genômica 5' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82 ou complemento destas, ou

(ii) uma região genômica 3' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82 ou complemento destas, e

em que a segunda sequência *primer* anela a uma região de inserção de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82 ou complemento destas, em que a região de inserção compreende os nucleotídeos 18.652-31.579 de SEQ ID NO: 5, os nucleotídeos 12.164-14.494 de SEQ ID NO: 6, os nucleotídeos 5.751-7.813 de SEQ ID NO: 7 ou os nucleotídeos 2.900-7.909 de SEQ ID NO: 82;

(b) amplificar um polinucleotídeo compreendendo uma das SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88; e

(c) confirmar se a mencionada amostra biológica compreende um polinucleotídeo que compreende uma das SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88 ou complemento destas.

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a detecção de um polinucleotídeo

que compreende as SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, ou complemento destas, por hibridização a uma sonda, onde a mencionada sonda hibridiza seletivamente sob condições estridentes de hibridização com um polinucleotídeo compreendendo as SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, ou complemento destas, em que mencionadas condições de hibridização são hibridização em formamida 50%, NaCl 1,0 M, SDS 1% e a 37°C, e uma lavagem em SSC 0,1 entre 60 e 65°C.

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que mencionados primeiro ou segundo *primer* compreendem um fragmento de uma região genômica 5' ou uma região genômica 3' de SEQ ID NOs: 5, 6, 7 ou 82, ou complemento destas.

5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que mencionados primeiro ou segundo *primer* compreendem um fragmento de uma região de inserção de SEQ ID NOs: 5, 6, 7 ou 82, ou complemento destas.

6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que mencionados primeiro ou segundo *primer* compreendem pelo menos 8 nucleotídeos consecutivos de uma região genômica 5' ou uma região genômica 3' de SEQ ID NOs: 5, 6, 7 ou 82, ou complemento destas.

7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que mencionados primeiro ou segundo *primer* compreendem pelo menos 6 nucleotídeos consecutivos de uma região de inserção de SEQ ID NOs: 5, 6, 7 ou 82, ou complemento destas.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que um dos mencionados primeiro ou segundo *primer* compreende um fragmento de pelo menos 6 nucleotídeos consecutivos de uma região

genômica 5' de SEQ ID NOs: 5, 6, 7 ou 82 ou complemento destas, e em que o outro dos mencionados primeiro ou segundo *primer* compreende um fragmento de pelo menos 6 nucleotídeos consecutivos de uma região genômica 3' de SEQ ID NOs: 5, 6, 7 ou 82, ou complemento destas.

9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que mencionados primeiro ou segundo *primer* compreendem as SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 89, 90, 91, 92, 93 ou 94, ou complemento destas.

10. MÉTODO PARA DETECTAR A PRESENÇA DE UM POLINUCLEOTÍDEO, que compreende as SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88 em uma amostra biológica contendo DNA, caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) extrair uma amostra de DNA da mencionada amostra biológica;
- (b) contactar a mencionada amostra de DNA com pelo menos um par de moléculas de *primers* de DNA selecionados a partir do grupo constituído de:
 - (i) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 26 e SEQ ID NO: 27;
 - (ii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 29 e SEQ ID NO: 30;
 - (iii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 31 e SEQ ID NO: 32;
 - (iv) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 33 e SEQ ID NO: 34;
 - (v) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 35 e SEQ ID NO: 36;
 - (vi) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 37 e SEQ ID NO: 38;
 - (vii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 39 e SEQ ID NO: 40;

- (viii) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 41 e SEQ ID NO: 42;
- (ix) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 43 e SEQ ID NO: 44;
- (x) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 45 e SEQ ID NO: 46;
- (xi) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 48;
- (xii) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 49;
- (xiii) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 50 e SEQ ID NO: 51;
- (xiv) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 52 e SEQ ID NO: 53;
- (xv) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 54 e SEQ ID NO: 49;
- (xvi) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 55 e SEQ ID NO: 46;
- (xvii) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 33 e SEQ ID NO: 56;
- (xviii) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 57 e SEQ ID NO: 58;
- (xix) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 59 e SEQ ID NO: 60;
- (xx) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 61 e SEQ ID NO: 36;
- (xxi) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 35 e SEQ ID NO: 62;
- (xxii) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 37 e SEQ ID NO: 63;
- (xxiii) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 64 e SEQ ID NO: 65;
- (xxiv) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67;
- (xxv) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 68 e SEQ ID NO: 69;
- (xxvi) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 70 e SEQ ID NO: 71;
- (xxvii) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 72 e SEQ ID NO: 73;
- (xxviii) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 74 e SEQ ID NO: 75;
- (xxix) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 76 e SEQ ID NO: 77;
- (xxx) seqüências compreendendo as SEQ ID NO: 78 e SEQ ID NO: 79;

- (xxxi) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 80 e SEQ ID NO: 81; e
- (xxxii) sequências compreendendo as SEQ ID NO: 89 e SEQ ID NO: 90;
- (c) fornecer condições para a reação de amplificação do DNA;
- (d) realizar a mencionada reação de amplificação do DNA produzindo assim uma molécula de DNA amplificada, e
- (e) detectar a mencionada molécula de DNA amplificada, em que a detecção da mencionada molécula de DNA amplificada indica a presença de um polinucleotídeo que compreende as SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, ou complemento destas.

11. MÉTODO PARA DETECTAR A PRESENÇA DE UMA SEQUÊNCIA, de SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88 em uma amostra biológica, caracterizado pelo fato de que o método compreende:

- (a) contatar a amostra biológica que compreende o DNA sob condições estridentes de hibridização com uma sonda polinucleotídicas, em que a mencionada sonda seletivamente hibridiza sob condições estridentes de hibridização com um polinucleotídeo que compreende as SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, ou complemento destas, em que mencionadas condições de hibridização são hibridização em formamida 50%, NaCl 1,0 M, SDS 1% e a 37°C e uma lavagem em SSC 0,1 entre 60 e 65°C, em que a sonda tem pelo menos 8 nucleotídeos de comprimento e é de um comprimento suficiente de nucleotídeos contíguos de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, ou complemento destas, para atuar como uma sonda de DNA que pode detectar especificamente e/ou identificar um DNA que compreende SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, ou complemento destas; e,

(b) detectar a hibridização da sonda no DNA.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a mencionada amostra compreende tecido de soja.

13. PAR DE *PRIMERS* DE DNA, caracterizado pelo fato de que compreende um primeiro *primer* de DNA e um segundo *primer* de DNA, em que os *primers* de DNA têm pelo menos 6 nucleotídeos de comprimento e têm um comprimento suficiente de nucleotídeos contíguos de SEQ ID NOs: 5, 6, 7 ou 82, ou complemento destas, para funcionar como *primers* de DNA que podem detectar e/ou identificar especificamente um DNA compreendendo as SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, ou complemento destas, e que a primeira sequência *primer* anela a:

(a) uma região genômica 5' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, ou complemento destas, ou

(b) uma região genômica 3' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, ou complemento destas, e

em que a segunda sequência *primer* anela a uma região de inserção de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82 ou complemento destas, em que a região de inserção compreende os nucleotídeos 18.652-31.579 de SEQ ID NO: 5, os nucleotídeos 12.164-14.494 de SEQ ID NO: 6, os nucleotídeos 5.751-7.813 de SEQ ID NO: 7 ou os nucleotídeos 2.900-7.909 de SEQ ID NO: 82.

14. MÉTODO PARA SELECIONAR SEMENTES, pela presença de um polinucleotídeo compreendendo as SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, caracterizado pelo fato de que mencionado método compreende:

(a) contatar uma amostra contendo o DNA da mencionada semente com um primeiro e um segundo *primer* de DNA, em que o primeiro *primer* anela a:

(i) uma região genômica 5' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, ou complemento destas, ou

(ii) uma região genômica 3' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, e em que a segunda sequência *primer* anela a uma região de inserção de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, ou complemento destas, em que a região de inserção compreende os nucleotídeos 18.652-31.579 de SEQ ID NO: 5, os nucleotídeos 12.164-14.494 de SEQ ID NO: 6, os nucleotídeos 5.751-7.813 de SEQ ID NO: 7 ou os nucleotídeos 2.900-7.909 de SEQ ID NO: 82;

(b) amplificar um polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo de SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88; e

(c) detectar mencionado polinucleotídeo amplificado.

15. MÉTODO PARA SELECIONAR SEMENTES, pela presença de um polinucleotídeo, compreendendo as SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88, caracterizado pelo fato de que mencionado método compreende:

(a) contatar a amostra compreendendo o DNA da mencionada semente sob condições estridentes de hibridização com uma sonda polinucleotídica que seletivamente hibridiza sob condições estridentes de hibridização com um polinucleotídeo compreendendo uma região de inserção de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, ou complemento desta, em que a região de inserção compreende os nucleotídeos 18.652-31.579 de SEQ ID NO: 5, os nucleotídeos 12.164-14.494 de SEQ ID NO: 6, os nucleotídeos 5.751-7.813 de SEQ ID NO: 7 ou os nucleotídeos 2.900-7.909 de SEQ ID NO: 82, em que mencionadas condições de hibridização são hibridização em formamida 50%, NaCl 1,0 M, SDS 1% e a 37°C e uma lavagem em SSC 0,1 entre 60 e 65°C; e

(b) detectar a hibridização da sonda ao DNA.

16. MÉTODO PARA PRODUZIR UM VEGETAL TOLERANTE

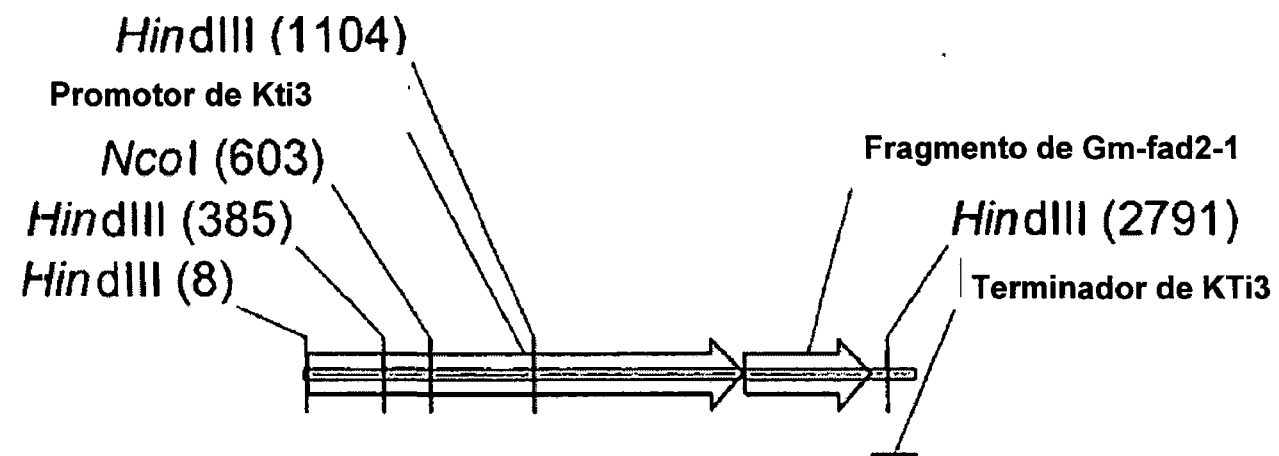
AO INIBIDOR DE ALS, caracterizado pelo fato de que compreende em reproduzir uma planta que compreende um polinucleotídeo que compreende nucleotídeos 18652-31579 de SEQ ID NO: 5, e selecionar a progênie pela análise de progênie que compreende um polinucleotídeo que compreende nucleotídeos 18652-31579 de SEQ ID NO: 5.

17. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o vegetal e a progênie compreendem adicionalmente um polinucleotídeo que compreende a SEQ ID NO: 6, um polinucleotídeo que compreende a SEQ ID NO: 7, e um polinucleotídeo que compreende a SEQ ID NO: 82.

18. PAR DE *PRIMERS* DE DNA, caracterizado pelo fato de que cada um compreende, pelo menos, 10 nucleotídeos que, quando utilizados em conjunto em um procedimento de amplificação de DNA, irão produzir um DNA amplificado compreendendo um polinucleotídeo de SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 82, 83, 84, 85, 86, 87 ou 88.

19. PAR, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que uma primeira sequência de *primer* é escolhida a partir do grupo constituído por (a) uma região genômica 5' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, ou complemento destas, e (b) uma região genômica 3' de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, ou complemento destas, e uma segunda sequência de *primer* é escolhida a partir de uma região de inserção de SEQ ID NO: 5, 6, 7 ou 82, ou complemento destas.

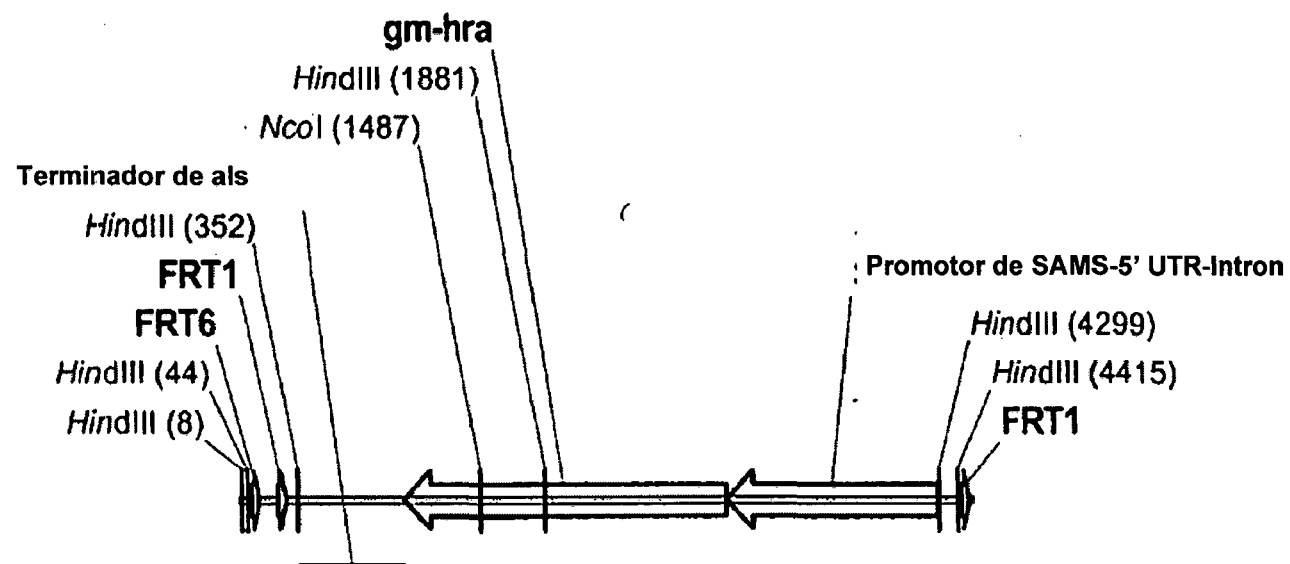
20. CONSTRUÇÃO DE UM DNA DE EXPRESSÃO, caracterizada pelo fato de que compreende o polinucleotídeo isolado, conforme descrito na reivindicação 1, operacionalmente ligado a pelo menos uma sequência reguladora.



PHP19340A

2924 bp

Fig. 1



PHP17752A
4512 bp

Fig. 2

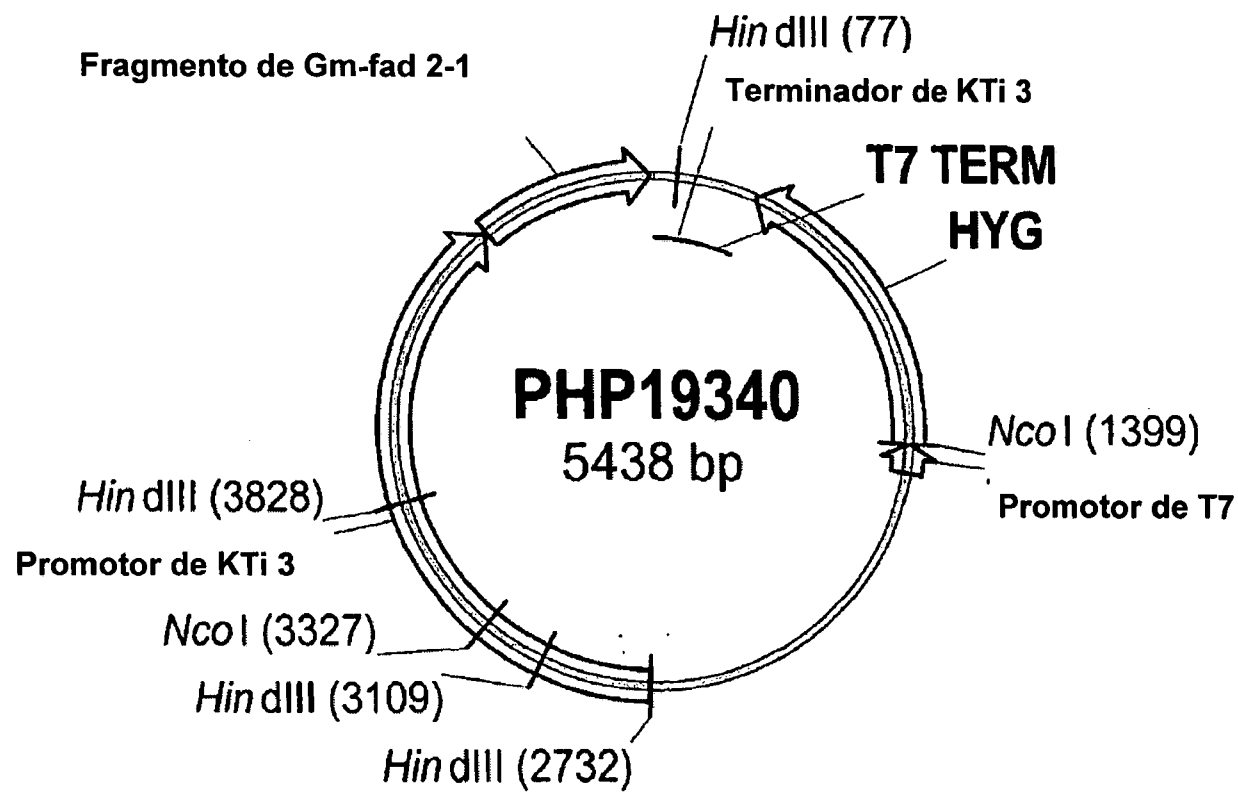
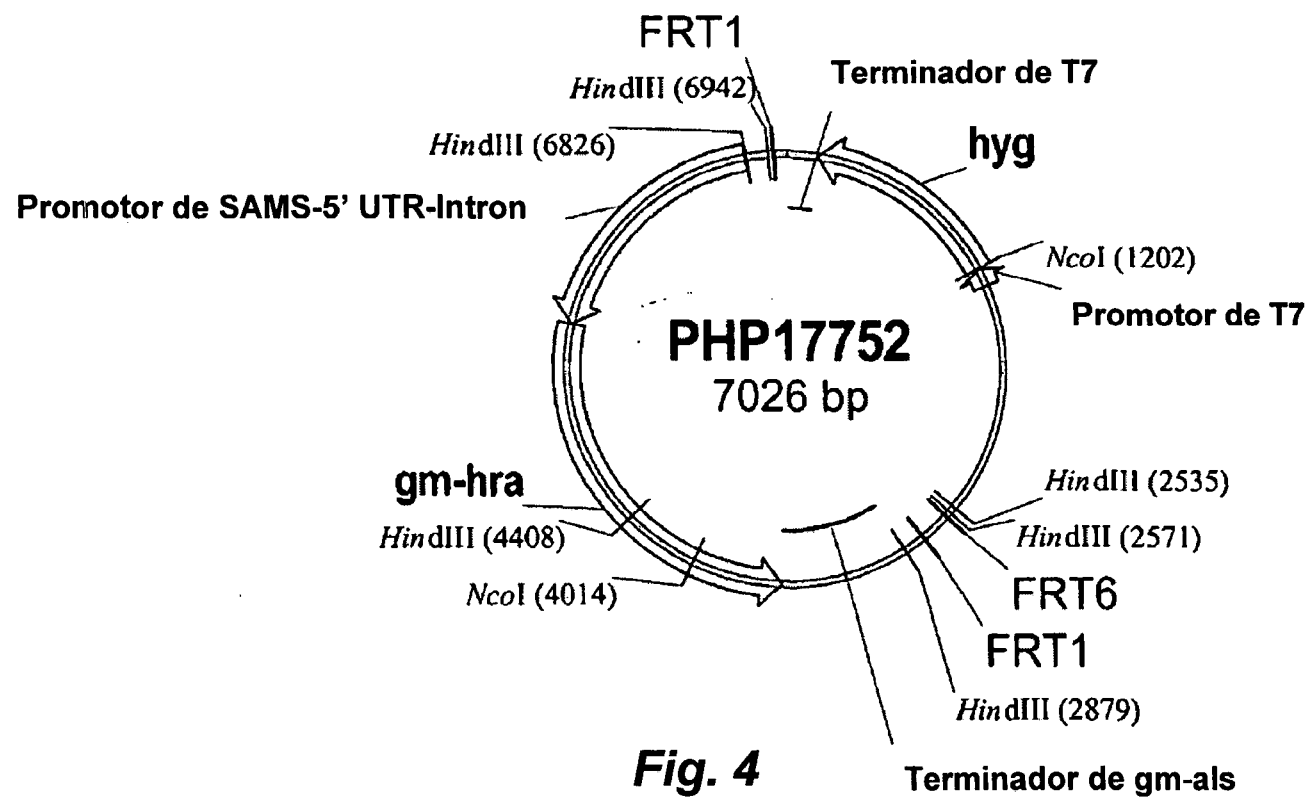


Fig. 3



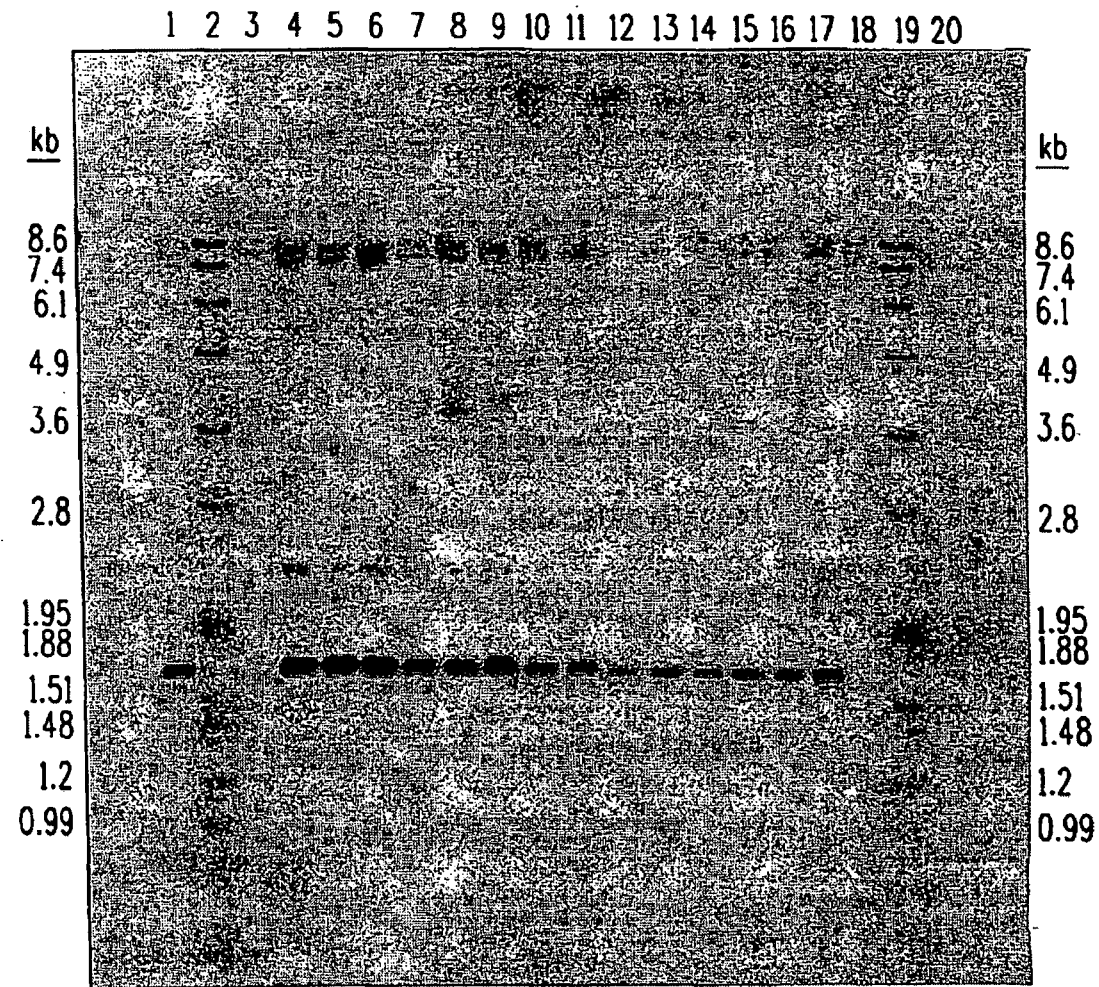


Fig. 5

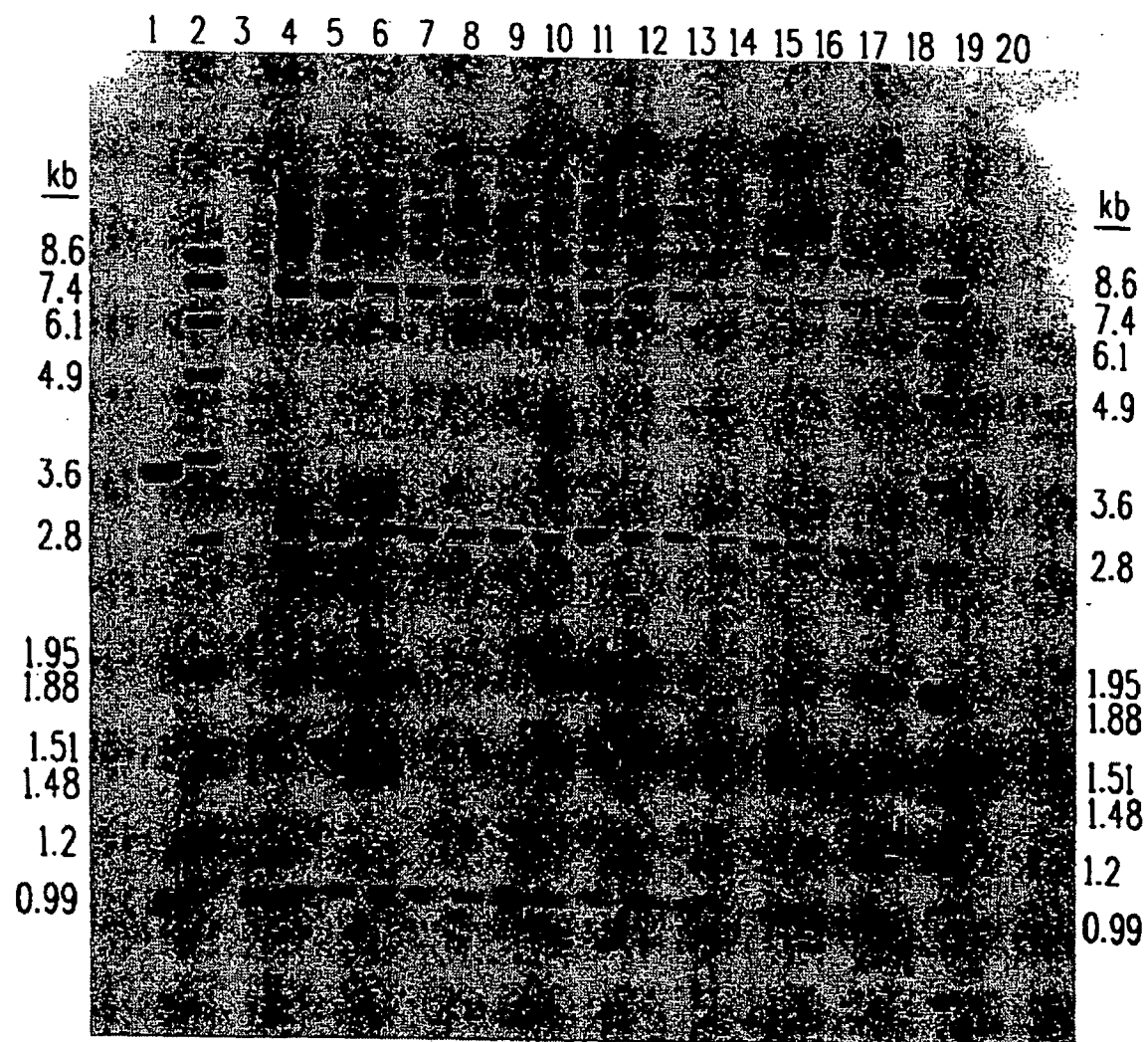


Fig. 6

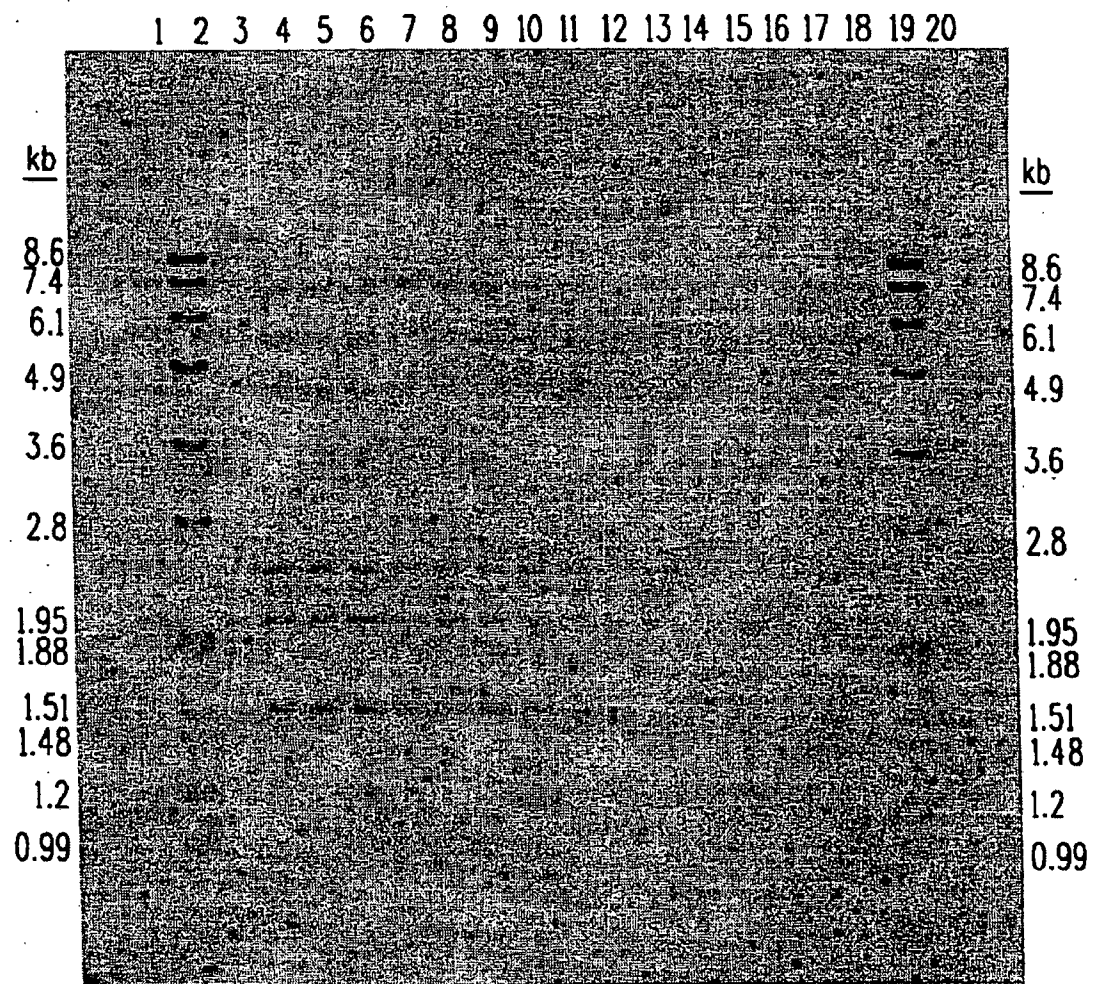


Fig. 7

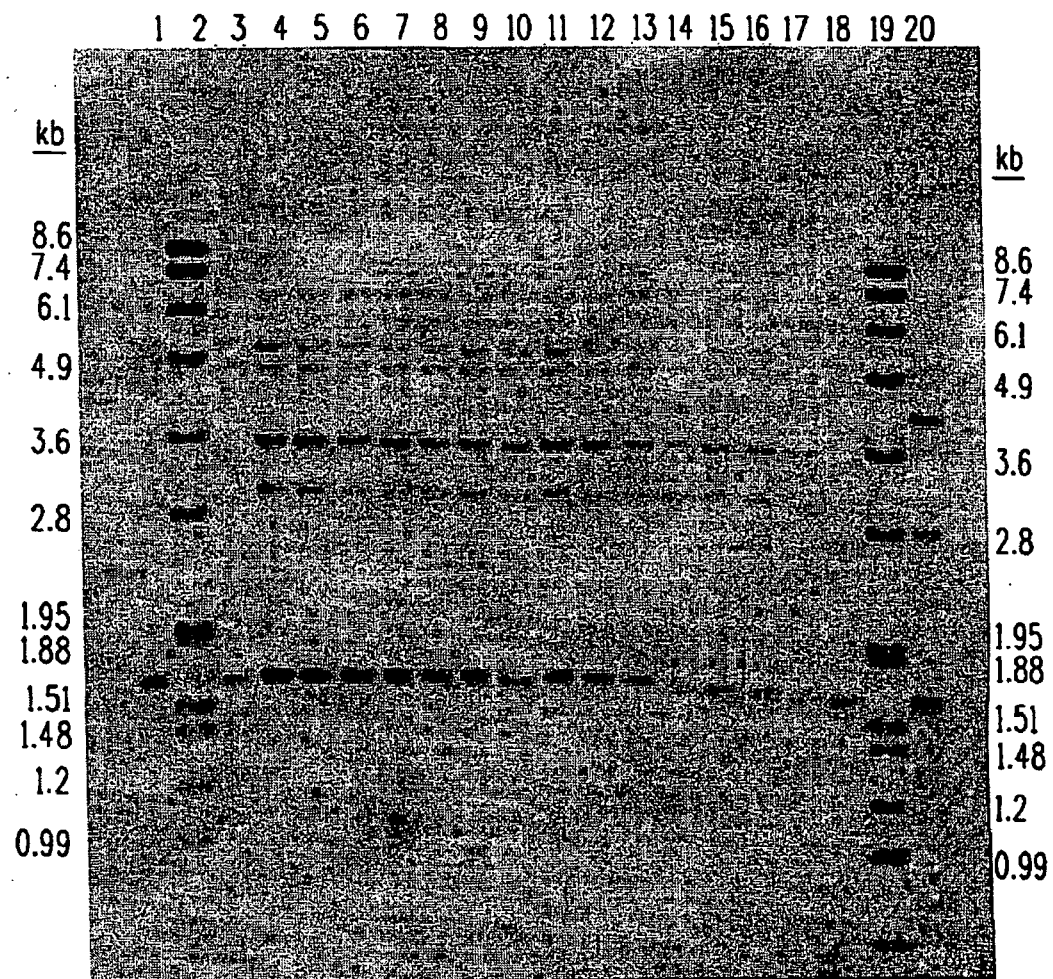
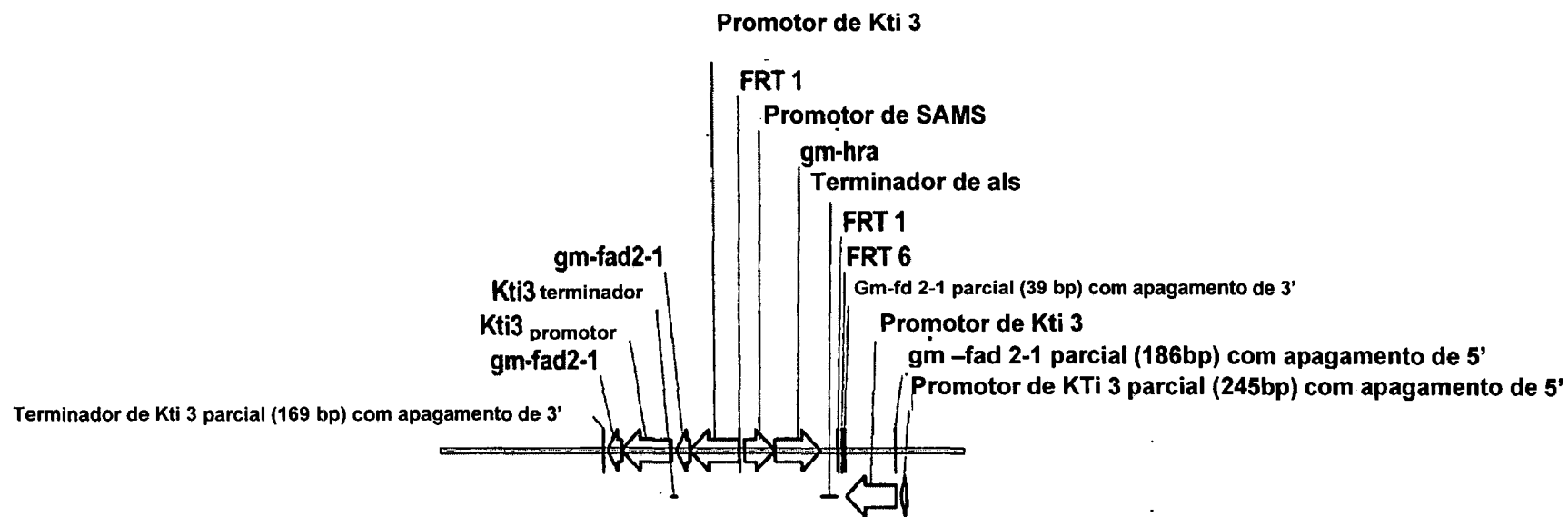


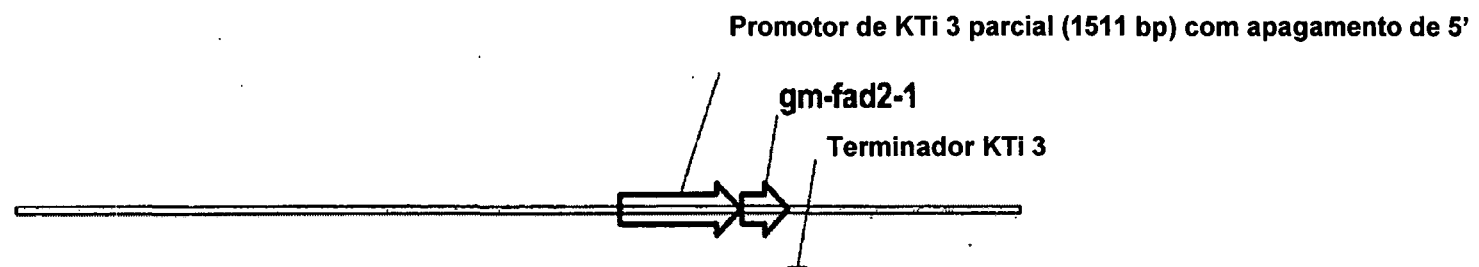
Fig. 8



Contig-1: Inserção-1 e regiões de fronteira com a divisa

22452 bp

Fig. 9

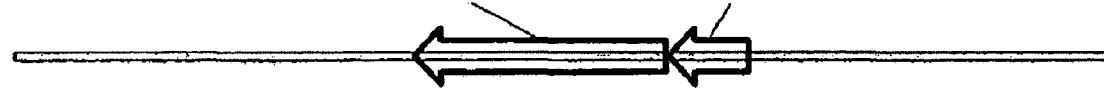


Contig 2: Inserção-2 e regiões de fronteira com a divisa
12667 bp

Fig. 10

Promotor de KTi 3 parcial (1550 bp) com apagamento de 3'

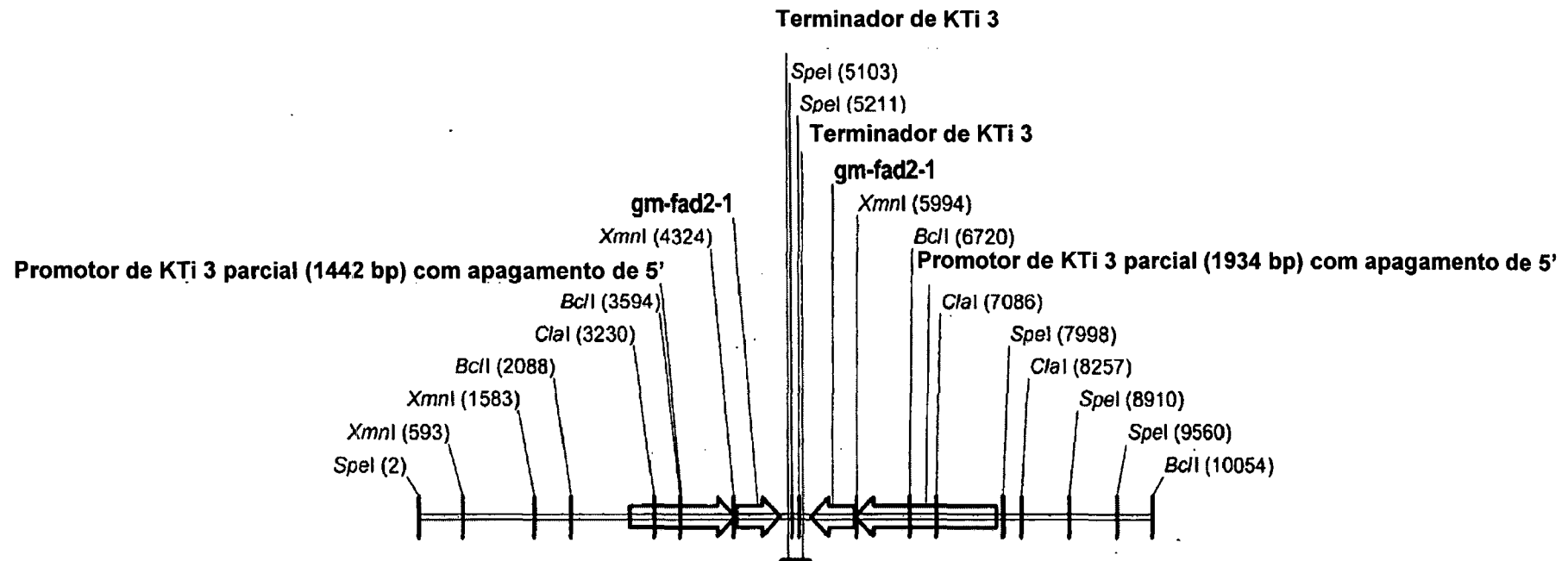
Coluna vertebral de plasmídeo 495 bp



Contig 3: Inserção-3 e regiões de fronteira com a divisa

6789 bp

Fig. 11



Contig-4: Inserção-4 e regiões de fronteira com a divisa

10058 bp

Fig. 12