



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

**(11) BR 122016025844-0 B1**



**(22) Data do Depósito: 24/05/2007**

**(45) Data de Concessão: 15/05/2018**

**(54) Título:** "COMPOSIÇÃO DERIVADA DE PLANTA DE MILHO TRANSGÊNICA COMPREENDENDO O EVENTO MON89034 OU PARTES DA MESMA".

**(51) Int.Cl.:** C12N 15/29; C12N 15/09

**(30) Prioridade Unionista:** 26/05/2006 US 60/808,834

**(73) Titular(es):** MONSANTO TECHNOLOGY LLC

**(72) Inventor(es):** HEATHER ANDERSON; JENNIFER DOUGLAS; JEANNA GROAT; SCOTT JOHNSON; REBECCA KELLY; JOHN KORTE; JAMES RICE

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"COMPOSIÇÃO DERIVADA DE PLANTA DE MILHO  
TRANSGÊNICA COMPREENDENDO O EVENTO MON89034 OU  
PARTES DA MESMA".**

[001] Dividido do PI0712921-1, depositado em 24.05.2007

REFERÊNCIA AOS PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS

[002] Este pedido reivindica o benefício de prioridade para o Pedido de Patente Provisório US Nº 60/808.834 depositado em 26 de maio de 2006.

Campo da Invenção

[003] A presente invenção refere-se ao evento de milho transgênico MON89034 e partes de planta e semente do mesmo. O evento exibe resistência à infestação de insetos dos insetos na ordem Lepidópteros. A invenção também refere-se aos métodos para usar plantas e sementes compreendendo DNA que é diagnóstico para a presença do evento transgênico quando sondado para a presença de sequências de nucleotídeo que são únicas para o evento transgênico, e aos métodos para detectar a presença do dito evento de milho em uma amostra biológica detectando sequências de nucleotídeo específicas que são únicas para o evento transgênico. A invenção fornece sequências de nucleotídeo que são únicas para o evento.

Antecedentes da Invenção

[004] Esta invenção refere-se à variedade transgênica resistente a Lepidópteros de planta de milho (*Zea mays*) referida aqui como evento MON89034, e às sequências de DNA únicas presentes que, quando detectadas em qualquer amostra ou variedade de milho, são diagnóstico para a presença do evento de planta de milho transgênica MON89034 naquela amostra ou variedade, e também refere-se à detecção da região de inserção do transgene/genômica em milho

MON89034, e plantas da progénie e sementes derivadas destas.

[005] O evento de planta de milho MON89034 é particularmente resistente a insetos na família de Lepidópteros tais como lagarta-militar (*Spodoptera frugiperda*), broca-do-colmo européia (*Ostrinia nubilalis*), lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*), broca-do-colmo (*Diatraea grandiosella*), e lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*) e outros, todos estes são pestes de insetos agronomicamente importantes.

[006] Milho é uma plantação importante e é uma fonte alimentícia primária em muitas áreas do mundo. Métodos de biotecnologia foram aplicados a milho para o propósito de melhorar os traços agronômicos e a qualidade do produto. Um tal traço agronômico é resistência a insetos, por exemplo, resistência geneticamente engenheirada para espécies lepidópteros e coleópteros que surgem geneticamente em plantas de milho engenheiradas para conter um ou mais genes que codificam agentes inseticidas (vide por exemplo, patente US 6.489.542 e patente US 6.620.988). É vantajoso detectar a presença de um evento transgênico particular em uma amostra biológica para determinar se uma ou mais progénies de um cruzamento sexual contêm o material transgênico. Por exemplo, a detecção do evento em uma amostra é importante para propósitos de autorização, para estabelecer e manter padrões de pureza, importante para obedecer órgãos fiscalizadores, para obedecer padrões de componentes alimentícios, para uso em procedimentos legais estabelecendo que um ou mais indivíduos ou entidades particulares têm usado o evento particular sem uma licença do proprietário ou licenciado de qualquer patente direcionada ao evento transgênico, e para assegurar complacência com várias regulações e/ou leis governamentais.

[007] Além disso, os métodos que permitem a detecção de uma planta particular seriam úteis quando obedecer as regulações que requerem a aprovação de pré-mercado e rotulação dos alimentos deri-

vados das plantas de plantação recombinantes. Indivíduos ou entidades que são resistentes à presença de um evento transgênico em uma amostra também desejam métodos seguros para detectar a presença do transgene em uma amostra a fim de que eles possam se capitalizar em seu negócio, tirando proveito de uma ausência dos transgenes em seus produtos.

[008] Apesar destas vantagens, é possível que os insetos possam evoluir a resistência às plantas que expressam apenas uma δ-endotoxina de *B. thuringiensis*. Tal resistência, caso venha a ser difundida, claramente limitaria o valor comercial de germoplasma contendo genes Bt simples.

[009] Um possível modo de aumentar a eficácia dos agentes inseticidas fornecidos por meio de plantas transgênicas e direcionados no controle de pestes de insetos alvos e contemporaneamente reduzir a probabilidade de aparecimento de pestes de inseto resistentes a tais agentes inseticidas seria assegurar que as plantações transgênicas expressassem níveis altos destes agentes inseticidas, tais como delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (McGaughey e Whalon (1992), Science 258:1451-55; Roush (1994) Biocontrol. Sci. Technol. 4:501-516). Além disso, tendo um repositório de genes inseticidas que são eficazes contra grupos de pestes de inseto e que manifestam seus efeitos através de modos diferentes de ação pode salvaguardar contra desenvolvimento da resistência. O princípio de resistência poderia ser substancialmente tardado como resultado de fornecer uma plantação que expresse duas ou mais atividades inseticidas exibindo toxicidade de sobreposição para as mesmas espécies de inseto. Um meio para alcançar tais modos duais de ação poderia ser fornecer uma planta expressando um gene Bt tóxico para uma espécie de inseto particular junto com um dsRNA que é fornecido para o propósito de alvejamento para supressão de um gene essencial da mesma espécie de inseto

alvejada pela toxina Bt, o dsRNA suscitando uma resposta de RNAi sob ingestão pela peste alvo, fornecendo um meio para redundância no evento do inseto desenvolver resistência ao dsRNA ou ao gene Bt. Alternativamente, co-expressão em uma planta de duas ou mais toxinas inseticidas ambas tóxicas para as mesmas espécies de inseto mas cada uma exibindo um modo diferente de realizar sua atividade de matança, particularmente quando ambas forem expressas em níveis altos, fornece um meio para gerenciamento eficaz da resistência. Exemplos de tais inseticidas úteis em tais combinações incluem mas não são limitados a toxinas de Bt, proteínas inseticidas de *Xenorhabdus* sp. ou *Photorhabdus* sp., proteínas de patatina e/ou permuteínas desalergenizadas e desglicosiladas, lectinas vegetais, e outras.

[0010] A expressão de genes estranhos em plantas é conhecida ser influenciada por sua posição cromossômica, talvez devido à estrutura de cromatina (por exemplo, heterocromatina) ou à proximidade dos elementos de regulação transcracional (por exemplo, intensificadores) perto do sítio de integração (Weising et al. (1988) *Ann. Rev. Genet* 22:421-477). Por este motivo, é frequentemente necessário triar um número grande de eventos para identificar um evento caracterizado por ótima expressão de um gene introduzido de interesse. Até mesmo depois, com dúzias ou até mesmo centenas de eventos transgênicos diferentes em mão, não há nenhuma certeza de sucesso em identificar um evento transgênico simples que forneça os níveis ótimos de expressão das pelo menos duas toxinas diferentes ou agentes inseticidas e careça de quaisquer deficiências agronômicas indesejáveis ou efeitos fitotóxicos, ou como resultado da inserção em alguma região essencial ou parcialmente essencial do genoma da planta, ou como resultado dos efeitos tóxicos provocados pelos níveis de expressão dos transgenes. Por exemplo, foi observado em plantas e em outros organismos que pode haver variação ampla nos níveis de expressão

de um gene introduzido entre os eventos. Pode também haver diferenças nos padrões espaciais ou temporais da expressão, por exemplo, diferenças na expressão relativa de um transgene em vários tecidos de planta que podem não corresponder aos padrões esperados de elementos reguladores transpcionais presentes na construção de gene introduzido. Por este motivo, é comum produzir várias centenas a vários milhares de eventos diferentes e triar os eventos para um evento simples que tem níveis e padrões de expressão de transgene desejados para propósitos comerciais. Um evento que tem os níveis ou padrões de expressão de transgene desejados é útil para introgredir o transgene em outros antecedentes genéticos por meio de cruzamento sexual sem conexão usando métodos de procriação convencionais. Progênie de tais cruzamentos mantém as características da expressão do transgene do transformante original. Esta estratégia é usada para assegurar expressão de gene segura em diversas variedades que são adaptadas adequadamente às condições crescentes locais específicas.

[0011] É possível detectar a presença de um transgene por qualquer método de detecção de ácido nucléico bem conhecido tal como a reação em cadeia de polimerase (PCR) ou hibridação de DNA usando sondas de ácido nucléico. Estes métodos de detecção em geral focam em elementos genéticos frequentemente usados, tais como promotores, terminadores, genes marcadores, ou até mesmo a sequência de codificação que codifica a proteína ou dsRNA de interesse expresso do(s) transgene(s), etc. Como resultado, tais métodos podem não ser úteis para discriminar entre eventos diferentes, particularmente aqueles produzidos usando a mesma construção de DNA, a menos que a sequência de DNA cromossômica adjacente ao DNA inserido ("DNA de flanqueamento") seja conhecida. Dependendo do método usado para introduzir o(s) transgene(s) em um genoma de planta, efeitos

aberrantes ou incomuns podem ser observados, que com frequência severamente complicam a identificação das sequências do genoma da planta flanqueando o DNA transgênico que foi intencionado ser introduzido na planta. Frequentemente, rearranjos do DNA inserido, rearranjos do DNA do genoma de flanqueamento, ou rearranjos tanto do DNA inserido como do DNA do genoma de flanqueamento são prevalentes, e complicam a análise do evento de inserção sendo avaliado. Portanto, é vantajoso ter um meio para selecionar, identificar, e assegurar a pureza e características de um evento transgênico particular em uma amostra, e o único modo para realizar isto é identificar uma ou mais sequências únicas associadas apenas com o evento transgênico desejado, e a presença de tais sequências em uma amostra biológica contendo o DNA das espécies de planta às quais o DNA transgênico foi inserido para dar origem ao evento é desse modo diagnóstico para o evento em tal amostra.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0012] A presente invenção refere-se à planta de milho transgênica designada MON89034 e progênie que são indistinguíveis do evento de milho MON89034 (na medida em que elas também contenham pelo menos um alelo que corresponda ao DNA transgênico inserido) do mesmo tendo semente depositada em 28 de março de 2006 junto à American Type Culture Collection (ATCC) com Acesso No. PTA-7455. Outro aspecto da invenção são as plantas de progênie, ou sementes, ou partes regeneráveis das plantas e sementes do evento de milho MON89034 que contêm um polinucleotídeo selecionado do grupo que consiste na SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, e SEQ ID N°: 5. A invenção também inclui partes de planta do evento de milho MON89034 que incluem, mas não são limitadas a pólen, óvulo, flores, brotos, raízes, talos, cabelos, pendões, espigas, e folhas, desde que estas partes contenham pelo menos os polinucleotídeos como ex-

postos acima. Composições genéticas novas contidas no genoma de MON89034 e produtos de MON89034 tais como refeição, farinha, óleo, polpa, e biomassa deixados em um campo de plantas de milho que correspondem ao evento de MON89034 são um aspecto desta invenção.

[0013] A invenção fornece uma planta de milho resistente a inseto tendo todas as características fisiológicas e morfológicas do evento de milho MON89034.

[0014] De acordo com um aspecto da invenção, composições e métodos são fornecidos para detectar a presença da região de inserção do transgene/genômica de uma planta de milho nova designada MON89034.

[0015] Sequências de DNA são fornecidas que compreendem pelo menos uma sequência de junção de MON89034 selecionada do grupo que consiste na SEQ ID N°: 1 (localizada nas posições 2051 a 2071 na SEQ ID N°: 5) e SEQ ID N°: 2 (localizada nas posições 11295 a 11314) e complementos das mesmas; em que uma sequência de junção atravessa a junção entre o DNA heterólogo inserido no genoma e o DNA da célula de milho flanqueando o sítio de inserção e é diagnóstico para o evento (Figura 1). Um evento de milho MON89034 e semente compreendendo estas moléculas de DNA são um aspecto desta invenção.

[0016] Sequências de DNA que compreendem a região de inserção do transgene/genômica nova, SEQ ID N°: 3 e SEQ ID N°: 4 (Figura 2) do evento de milho MON89034 são aspectos desta invenção. A planta de milho e semente compreendendo estas moléculas são também aspectos desta invenção.

[0017] De acordo com outro aspecto da invenção, duas moléculas de DNA são fornecidas para o uso em um método de detecção de DNA, em que a primeira molécula de DNA compreende pelo menos 11

ou mais polinucleotídeos contíguos de qualquer porção da região de transgene da molécula de DNA da SEQ ID N<sup>º</sup>: 3 e uma molécula de DNA de comprimento similar de qualquer porção de uma região de DNA genômica de milho de flanqueamento de 5' da SEQ ID N<sup>º</sup>: 3 onde estas moléculas de DNA quando usadas junto são úteis como iniciadores de DNA em um método de amplificação de DNA que produz um amplicon. O amplicon produzido usando estes iniciadores de DNA no método de amplificação de DNA é diagnóstico para evento de milho MON 89304 quando o amplicon contiver a SEQ ID N<sup>º</sup>: 1. Qualquer amplicon produzido por iniciadores de DNA homólogos ou complementares a qualquer porção da SEQ ID N<sup>º</sup>: 3 e qualquer amplicon compreendendo a SEQ ID N<sup>º</sup>: 1 é um aspecto da invenção.

[0018] De acordo com outro aspecto da invenção, duas moléculas de DNA são fornecidas para o uso em um método de detecção de DNA, em que a primeira molécula de DNA compreende pelo menos 11 ou mais polinucleotídeos contíguos de qualquer porção da região de transgene da molécula de DNA da SEQ ID N<sup>º</sup>: 4 e uma molécula de DNA de comprimento similar de qualquer porção de um DNA genômico de flanqueamento de milho de 3' da SEQ ID N<sup>º</sup>: 4 onde estas moléculas de DNA são úteis como iniciadores de DNA em um método de amplificação de DNA. O amplicon produzido usando estes iniciadores de DNA no método de amplificação de DNA é diagnóstico para evento de milho MON 89304 quando o amplicon contiver a SEQ ID N<sup>º</sup>: 2. Quaisquer amplicons produzidos por iniciadores de DNA homólogos ou complementares a qualquer porção da SEQ ID N<sup>º</sup>: 4 e qualquer amplicon compreendendo a SEQ ID N<sup>º</sup>: 2 são um aspecto da invenção.

[0019] De acordo com outro aspecto da invenção, métodos de detectar a presença de DNA que corresponde ao evento de milho MON89034 em uma amostra são fornecidos. Tais métodos compreen-

dem: (a) contatar a amostra compreendendo o DNA com um conjunto de iniciador que, quando usado em uma reação de amplificação de ácido nucléico com DNA genômico do evento de milho MON89034, produz um amplicon que é diagnóstico para evento de milho MON89034; (b) executar uma reação de amplificação de ácido nucléico, assim produzindo o amplicon; e (c) detectar o amplicon em que o dito amplicon compreende SEQ ID Nº: 1 ou SEQ ID Nº: 2.

[0020] Uma planta de milho, ou semente, ou produto derivado da planta ou semente MON89034 em que o DNA genômico compreende uma molécula de DNA que consiste essencialmente em SEQ ID Nº: 5 e complementos dos mesmos. Uma planta de milho, ou semente, ou produto derivado da planta ou semente MON89034 em que o DNA genômico quando isolado da planta de milho, ou semente, ou produto compreende uma molécula de DNA incorporando os nucleotídeos 2061 a 11305 da SEQ ID Nº: 5 e complementos da mesma.

[0021] Uma planta de milho, ou semente, ou produto derivado da planta ou semente MON89034 em que o DNA genômico quando isolado da planta de milho, ou semente, ou produto produz um amplicon em um método de amplificação de DNA, em que DNA iniciador moléculas SEQ ID Nº: 6 e SEQ ID Nº: 7 é usado no método de amplificação de DNA.

[0022] De acordo com outro aspecto da invenção, os métodos de detectar a presença de um DNA que corresponde ao evento de MON89034 em uma amostra, tais métodos compreendendo: (a) contatar a amostra compreendendo o DNA com uma sonda que hibrida sob condições de hibridação rigorosa com DNA genômico do evento de milho MON89034 e não hibrida sob as condições de hibridação rigorosa com uma planta de milho de controle; (b) submeter a amostra e sonda a condições de hibridação rigorosa; e (c) detectar a hibridação da sonda com o DNA do evento de milho MON89034 em que a dita

sonda compreende SEQ ID Nº: 1 e SEQ ID Nº: 2.

[0023] Outro aspecto da invenção é um método de determinar a zigosidade da progênie do evento de milho MON89034 que compreende: (a) contatar a amostra compreendendo DNA de milho com um conjunto de iniciador que compreende SQ2842 (SEQ ID Nº: 6), SQ2843 (SEQ ID Nº: 7), SQ6523 (SEQ ID Nº: 10), SQ6524 (SEQ ID Nº: 11), PB880 (SEQ ID Nº: 14) e PB2931 (SEQ ID Nº: 15) que quando usado em uma reação de amplificação de ácido nucléico com DNA genômico do evento de milho MON89034, produz um primeiro amplicon que é diagnóstico para evento de milho MON89034 e (b) executar uma reação de amplificação de ácido nucléico, assim produzindo o primeiro amplicon; e (c) detectar o primeiro amplicon; e (d) contatar a amostra compreendendo DNA de milho com o dito conjunto de iniciador que quando usado em uma reação de amplificação de ácido nucléico com DNA genômico das plantas de milho produz um segundo amplicon compreendendo o DNA genômico nativo de milho homólogo à região genômica de milho de uma inserção do transgene identificada como evento de milho MON89034; e (e) executar uma reação de amplificação de ácido nucléico, assim produzindo o segundo amplicon e (f) detectar o segundo amplicon; e (g) comparar o primeiro e segundo amplicons em uma amostra, em que a presença de ambos os amplicons indica que a amostra é heterozigota para a inserção do transgene.

[0024] Um aspecto da invenção é fornecer na dieta de uma peste lepidóptero uma quantidade inseticidamente eficaz do evento de milho MON89034.

[0025] Outro aspecto da presente invenção é fornecer uma composição ou amostra biológica na forma de uma mercadoria ou gênero alimentício que é derivado do evento de milho MON89034, a mercadoria ou gênero alimentício compreendendo espigas de milho, milho de-

bulhado, cabelos de milho, pólen de milho, milho quebrado, fubá, milho esmagado, farinha de milho, óleo de milho, amido de milho, água de maceração de milho, malte de milho, açúcar de milho, xarope de milho, margarina produzida de óleo de milho, óleo de milho insaturado, óleo de milho saturado, flocos de milho, milho de pipoca, etanol e/ou licor produzido de milho ou produtos de milho compreendendo o DNA diagnóstico para evento de milho MON89034, sólidos de produtos perencíveis de destiladores (DDGS) produzidos de fermentação de tal evento de milho, e alimentações animais compreendendo tais DDGS e/ou milho, se ou não inteiro, quebrado, ou esmagado, gêneros alimentícios processados, um cosmético, e um agente de massa em que é encontrada uma quantidade detectável de um polinucleotídeo que é diagnóstico para a presença do evento de milho transgênico MON89034 na amostra biológica. Um meio alternativo para fornecer milho como um gênero alimentício é fornecer milho em várias formas de grão para alimentação, tais como milho inteiro, milho quebrado, milho esmagado, e várias formas dos antecedentes em uma mistura com milo, sebo, painço, girassol, aveias, trigo, arroz, feijões, e outros. Quantidades detectáveis de uma sequência de nucleotídeo em tal mercadoria ou gênero alimentício, tal como é exposto na SEQ ID N°: 1 ou SEQ ID N°: 2, ou os complementos das mesmas, são diagnósticos para a presença de tal DNA de do evento transgênico MON89034 na amostra, e portanto, a presença das células do evento transgênico como tendo originado o DNA na amostra.

[0026] O antecedente e outros aspectos da invenção ficarão mais evidentes da descrição detalhada a seguir.

#### DESENHOS

[0027] Figura 1. Organização da inserção do transgene presente dentro do genoma do evento de milho transgênico MON89034. A barra aberta ou branca central representa o DNA inserido. Abaixo da barra

branca está um diagrama que representa os vários elementos dentro do DNA inserido. As terminações do DNA inserido foram designadas arbitrariamente como 5' (ao lado esquerdo da Figura) e 3' (ao lado direito da Figura). As sequências ou segmentos da Borda Direita e da Borda Esquerda são marcados em baixo de cada extremidade do diagrama ilustrando os vários elementos dentro do DNA inserido. Os elementos marcados nos cassetes de expressão dentro do DNA inserido são, em ordem sucessiva a partir da Borda Direita: o promotor de e35S, o líder não-transladado de CAB de trigo, ítron de actina de arroz, sequência de codificação para Cry1A.105, sequência de terminação e de poliadenilação de 3' de HSP17 de trigo, promotor de FMV, ítron de hsp70, sequência de codificação de peptídeo alvo de cloroplasto de subunidade pequena da rubisco, sequência de codificação de Cry2Ab, na sequência sinal de terminação e poliadenilação de 3', e depois a Borda Esquerda. As barras verticalmente traçadas em qualquer extremidade da barra aberta ou branca central correspondem às sequências de flanqueamento do genoma de milho de 5' e 3' arbitrariamente marcadas. A linha preta mais longa acima da barra traçada e aberta ou branca representa SEQ ID N°: 5 (a sequência de comprimento total representada pela figura que descreve a sequência de flanqueamento de 5', a sequência de DNA inserida, e a sequência de flanqueamento de 3'). As linhas pretas mais curtas acima e abaixo da linha preta marcada como SEQ ID N°: 5 representam as posições aproximadas dentro da SEQ ID N°: 5 em que cada uma das sequências especificamente marcadas podem ser encontradas (isto é, SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, e SEQ ID N°: 4). SEQ ID N°: 1 e SEQ ID N°: 2, e qualquer sequência derivada do evento de milho MON89034 contendo SEQ ID N°: 1 e/ou SEQ ID N°: 2, somos diagnósticos para DNA do evento de milho MON89034 em uma amostra biológica.

## DESCRIÇÃO DETALHADA

[0028] As definições a seguir e métodos são fornecidos para melhor definir a presente invenção e guiar aqueles de habilidade usual na técnica na prática da presente invenção. A menos que do contrário observado, os termos serão entendidos de acordo com uso convencional por aqueles de habilidade usual na técnica relevante. Definições de termos comuns em biologia molecular podem também ser encontradas em Rieger et al., *Glossary of Genetic: Classic and Molecular* 5<sup>a</sup> edição, Springer - Verlag: Nova Iorque, 1991; e Lewin, *Genes V*, Oxford University Press: Nova Iorque, 1994.

[0029] Como aqui usado, o termo "milho" significa *Zea mays* ou milho e inclui todas as variedades de planta que possam ser produzidas com milho, incluindo espécies de milho selvagem.

[0030] Como aqui usado, o termo "compreendendo" significa "incluindo mas não limitado".

[0031] Um "evento" transgênico é produzido pela transformação das células de planta com DNA heterólogo, isto é, uma construção de ácido nucléico que inclui um transgene de interesse, regeneração de uma população de plantas resultando da inserção do transgene no genoma da planta, e seleção de uma planta particular caracterizada por inserção em uma localização de genoma particular. O termo "evento" refere-se ao transformante original e progênie do transformante que inclui o DNA heterólogo. O termo "evento" também refere-se à progênie produzida por um cruzamento sexual entre o transformante e outra variedade incluindo o DNA heterólogo. Até mesmo após retrocruzamento repetido com um pai recorrente, o DNA inserido e DNA de flanqueamento do pai transformado estão presentes na progênie do cruzamento na mesma localização cromossômica. O termo "evento" também refere-se ao DNA do transformante original compreendendo o DNA inserido e sequência genômica de flanqueamento imediatamente

adjacente ao DNA inserido que seria esperado que fosse transferido para uma progênie que recebe o DNA inserido incluindo o transgene de interesse como o resultado de um cruzamento sexual de uma linha parental que inclui o DNA inserido (por exemplo, o transformante original e progênie resultante do autocruzamento) e uma linha parental que não contém o DNA inserido. A presente invenção refere-se ao DNA do evento MON89034, células de planta, tecidos, sementes e produtos processados derivados de MON89034.

[0032] É também para ser entendido que duas plantas transgênicas diferentes podem também ser acasaladas para produzir descendência que contém dois genes exógenos segregantes independentemente adicionados. Autocruzamento apropriado da progênie pode produzir plantas que são homozigotos para ambos os genes exógenos adicionados. Retrocruzamento de uma planta parental e cruzamento sem conexão com uma planta não-transgênica são também contemplados, como é propagação vegetativa. Descrições de outros métodos de procriação que são comumente usados para traços diferentes e plantações podem ser encontradas em uma das várias referências, por exemplo, Fehr, Breeding Methods for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

[0033] Uma "sonda" é um ácido nucléico isolado ao qual está ligada uma marcação detectável convencional ou molécula repórter, por exemplo, um isótopo radioativo, ligante, agente quimioluminescente, ou enzima. Uma tal sonda é complementar a um filamento de um ácido nucléico alvo, no caso da presente invenção, para um filamento de DNA genômico do evento de milho MON89034 quer de uma planta de milho quer de uma amostra que inclui o DNA do evento. Sondas de acordo com a presente invenção não só incluem ácidos desoxirribonucléicos ou ribonucléicos mas também poliamidas e outros materiais de sonda que especificamente ligam a uma sequência de DNA alvo e po-

dem ser usados para detectar a presença daquela sequência de DNA alvo.

[0034] "Iniciadores" são ácidos nucléicos isolados que são anelados a um filamento de DNA alvo complementar por hibridação de ácido nucléico para formar um híbrido entre o iniciador e o filamento de DNA alvo, depois estendido ao longo do filamento de DNA alvo por uma polimerase, por exemplo, uma DNA polimerase. Pares de iniciador da presente invenção referem-se a seu uso para amplificação de uma sequência de ácido nucléico alvo, por exemplo, pela reação em cadeia de polimerase (PCR) ou outros métodos de amplificação de ácido nucléico convencionais.

[0035] Sondas e iniciadores são em geral 11 nucleotídeos ou mais em comprimento, preferivelmente 18 nucleotídeos ou mais, mais preferivelmente 24 nucleotídeos ou mais, e o mais preferivelmente 30 nucleotídeos ou mais. Tais sondas e iniciadores especificamente hibridam com a uma sequência alvo sob condições de hibridação de severidade alta. Preferivelmente, sondas e iniciadores de acordo com a presente invenção têm similaridade de sequência completa com a sequência alvo, embora as sondas que diferem da sequência alvo e que retêm a habilidade para hibridar com as sequências alvos possam ser projetadas através de métodos convencionais.

[0036] Métodos para preparar e usar sondas e iniciadores são descritos, por exemplo, em Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (doravante, "Sambrook et al., 1989"); Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nova Iorque, 1992 (com atualizações periódicas) (doravante, "Ausubel et al., 1992"); e Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990. Pares de iniciador de PCR podem ser deriva-

dos de uma sequência conhecida, por exemplo, usando programas de computação intencionados para aquele propósito tais como Primer (Version 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

[0037] Iniciadores e sondas com base nas sequências de DNA de flanqueamento e de inserção descritas aqui podem ser usados para confirmar (e, se necessário, corrigir) as sequências descritas através de métodos convencionais, por exemplo, reclonagem e sequenciação de tais sequências.

[0038] As sondas de ácido nucléico e iniciadores da presente invenção hibridam sob condições rigorosas com uma sequência de DNA alvo. Qualquer método hibridação ou de amplificação de ácido nucléico convencional pode ser usado para identificar a presença de DNA de um evento transgênico em uma amostra. Moléculas de ácido nucléico ou fragmentos das mesmas são capazes de especificamente hibridar com as outras moléculas de ácido nucléico sob certas circunstâncias. Como aqui usado, as duas moléculas de ácido nucléico são ditas ser capazes de especificamente hibridar uma com a outra se as duas moléculas forem capazes de formar uma estrutura de ácido nucléico anti-paralela, bifilamentar. É dito que uma molécula de ácido nucléico é o "complemento" de outra molécula de ácido nucléico se elas exibirem complementaridade completa. Como aqui usado, as moléculas são ditas apresentar "complementaridade completa" quando cada nucleotídeo de uma das moléculas for complementar a um nucleotídeo da outra. As duas moléculas são ditas ser "minimamente complementar" se elas puderem hibridar uma com a outra com estabilidade suficiente para as permitir permanecer aneladas entre si sob condições convencionais de "severidade baixa". Similarmente, é o dito que as moléculas são "complementares" se elas puderem hibridar umas com as outras com estabilidade suficiente para as permitir permanecer aneladas

umas às outras sob condições convencionais de "severidade alta". Condições convencionais de severidade são descritas por Sambrook et al., 1989, e por Haymes et al., Em: Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985). Abandonos de complementaridade completa são portanto permissíveis, contanto que tais abandonos não impeçam a capacidade das moléculas de formar uma estrutura completamente bifilamentar. Para que uma molécula de ácido nucléico sirva como um iniciador ou sonda ela necessita apenas ser em sequência suficientemente complementar para poder formar uma estrutura bifilamentar estável sob as concentrações de solvente e de sal particulares empregadas.

[0039] Como aqui usado, uma sequência substancialmente homóloga é uma sequência de ácido nucléico que especificamente hibridar com o complemento da sequência de ácido nucléico à qual está sendo comparada sob condições de severidade alta. Condições de severidade apropriadas que promovem hibridação de DNA, por exemplo, 6,0 x cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) em cerca de 45°C, seguido por uma lavagem de 2,0 x SSC a 50°C, são conhecidas àquelas versados na técnica ou podem ser encontradas em Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por exemplo, a concentração de sal na etapa de lavagem pode ser selecionada de uma severidade baixa de cerca de 2,0 x SSC a 50°C a uma severidade alta de cerca de 0,2 x SSC a 50°C. Além disso, a temperatura na etapa de lavagem pode ser aumentada de condições de severidade baixa em temperatura ambiente, cerca de 22°C, para condições de severidade alta em cerca de 65°C. Tanto temperatura como sal podem ser variados, ou a temperatura ou a concentração de sal podem ser mantidas constantes enquanto a outra variável é alterada. Em uma modalidade preferida, um ácido nucléico da presente invenção hibrida especificamente com uma ou mais das moléculas de ácido nucléico

expostas na SEQ ID Nº: 1 e 2 ou complementos ou fragmentos das mesmas ou sob condições moderadamente rigorosas, por exemplo a cerca de 2,0 x SSC e cerca de 65°C. Em uma modalida de particularmente preferida, um ácido nucléico da presente invenção especificamente hibridar com uma ou mais das moléculas de ácido nucléico expostas na SEQ ID Nº: 1 e SEQ ID Nº: 2 ou complementos ou fragmentos ou sob condições de severidade alta. Em um aspecto da presente invenção, uma molécula de ácido nucléico de marcador preferida da presente invenção tem a sequência de ácido nucléico exposta na SEQ ID Nº: 1 e SEQ ID Nº: 2 ou complementos ou fragmentos das mesmas. Em outro aspecto da presente invenção, uma molécula de ácido nucléico de marcador preferida da presente invenção compartilha entre 80% e 100% ou 90% e 100% de identidade de sequência com a sequência de ácido nucléico exposta na SEQ ID Nº: 1 e SEQ ID Nº: 2 ou complemento ou fragmentos das mesmas. Em um outro aspecto da presente invenção, uma molécula de ácido nucléico de marcador preferida da presente invenção compartilha entre 95% e 100% de identidade de sequência com a sequência exposta na SEQ ID Nº: 1 e SEQ ID Nº: 2 ou complemento ou fragmentos das mesmas. SEQ ID Nº: 1 e SEQ que ID Nº: 2 podem ser usadas como marcadores em métodos de melhoramento genético de plantas para identificar a progénie de cruzamentos genéticos similares aos métodos descritos para análise de marcador de DNA de repetição de sequência simples, em "DNA markers: Protocols, applications, and overviews: (1997) 173-185, Cregan, et al., eds., Wiley-Liss NY; todas estas são incorporadas aqui por referência em sua totalidade. A hibridação da sonda para a molécula de DNA alvo pode ser detectada por qualquer número de métodos conhecidos àqueles versados na técnica, estes podem incluir, mas não são limitados a, marcadores fluorescentes, marcadores radioativos, marcadores com base em anticorpo, e marcadores quimioluminescen-

tes.

[0040] Com relação à amplificação de uma sequência de ácido nucléico alvo (por exemplo, por PCR) usando um par de iniciadores de amplificação particular, "condições rigorosas" são condições que permitem o par de iniciadores hibridar com apenas a sequência de ácido nucléico alvo à qual um iniciador tendo a sequência do tipo selvagem correspondente (ou seu complemento) ligaria e preferivelmente para produzir um produto de amplificação único, o amplicon, em um reação de amplificação térmica de DNA.

[0041] O termo "específico para (uma sequência alvo)" indica que uma sonda ou iniciador hibrida sob condições de hibridação rigorosa apenas com a sequência alvo em uma amostra compreendendo a sequência alvo.

[0042] Como aqui usado, "DNA amplificado" ou "amplicon" refere-se ao produto da amplificação de ácido nucléico de uma sequência de ácido nucléico alvo que faz parte de um modelo de ácido nucléico. Por exemplo, para determinar se a planta de milho resultante de um cruzamento sexual contém DNA genômico do evento transgênico da planta de milho da presente invenção, o DNA extraído de uma amostra de tecido de planta de milho pode ser submetido ao método de amplificação de ácido nucléico usando um par de iniciadores que inclui um iniciador derivado da sequência de flanqueamento no genoma da planta adjacente ao sítio de inserção de DNA heterólogo inserido, e um segundo iniciador derivado do DNA heterólogo inserido para produzir um amplicon que é diagnóstico para a presença do DNA do evento. O amplicon é de um comprimento e tem uma sequência que é também diagnóstico para o evento. O amplicon pode variar em comprimento do comprimento combinado dos pares de iniciador mais um par de base de nucleotídeo, preferivelmente mais cerca de cinquenta pares de base de nucleotídeo, mais preferivelmente mais cerca de duzentos e cin-

quenta pares de base de nucleotídeo, e até mesmo mais preferivelmente mais cerca de quatrocentos e cinquenta pares de base de nucleotídeo. Alternativamente, um par de iniciadores pode ser derivado da sequência de flanqueamento em ambos os lados do DNA inserido para produzir um amplicon que inclui a sequência de nucleotídeo inserida inteira. Um membro de um par de iniciadores derivado da planta sequência genômica pode ser localizada uma distância da molécula de DNA inserida, esta distância pode variar de um par de base de nucleotídeo até cerca de vinte mil pares de base de nucleotídeo. O uso do termo "amplicon" especificamente exclui dímeros de iniciador que podem ser formados na reação de amplificação térmica de DNA.

[0043] Amplificação de ácido nucléico pode ser realizada por quaisquer dos vários métodos de amplificação de ácido nucléico conhecidos na técnica, incluindo a reação em cadeia de polimerase (PCR). Uma variedade de métodos de amplificação é conhecida na técnica e é descrita, *inter alia*, nas patentes U. S. N<sup>os</sup> 4.683.195 e 4.683.202 e em PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis et al., Academic Press, San Diego, 1990. Métodos de amplificação de PCR foram desenvolvidos para amplificar até 22 kb de DNA genômico e até 42 kb de DNA de bacteriófago (Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994). Estes métodos como também outros métodos conhecidos na técnica de amplificação de DNA podem ser usados na prática da presente invenção. A sequência da inserção de DNA heterólogo ou sequência de flanqueamento do evento de milho MON89034 com amostras de semente depositadas como números de ATCC podem ser verificadas (e corrigidas se necessário) amplificando tais sequências do evento usando iniciadores derivados das sequências fornecidas aqui seguido por sequenciação de DNA padrão do amplicon de PCR ou do DNA clonado.

[0044] O amplicon produzido por estes métodos podem ser detec-

tados por uma pluralidade de técnicas. Um tal método é Genetic Bit Analysis (Nikiforov, et al. Nucleic Acid Res. 22:4167-4175, 1994) onde um oligonucleotídeo de DNA é projetado que sobrepõe tanto a sequência de DNA genômico de flanqueamento adjacente e a sequência de DNA inserida. O oligonucleotídeo é imobilizado em poços de uma placa de micropoços. Segundo PCR da região de interesse (usando um iniciador na sequência inserida e um na sequência genômica de flanqueamento adjacente), um produto de PCR unifilamentar pode ser hibridado com o oligonucleotídeo imobilizado e servir como um modelo para uma reação de extensão de base simples usando uma DNA polimerase e ddNTPs marcados específicos para a próxima base esperada. Estágio de leitura pode ser fluorescente ou com base em ELISA. Um sinal indica presença da sequência de inserção/flanqueamento devido à amplificação, hibridação, e extensão de base simples bem sucedidas.

[0045] Outro método é a técnica de piro sequenciação como descrita por Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). Neste método, um oligonucleotídeo é projetado que sobrepõe o DNA genômico adjacente e a junção de DNA de inserção. O oligonucleotídeo é hibridado com o produto de PCR unifilamentar da região de interesse (um iniciador na sequência inserida e um na sequência genômica de flanqueamento) e incubado na presença de uma DNA polimerase, ATP, sulfurlase, luciferase, apirase, fosfossulfato de 5' adenosina e luciferina. dNTP é adicionado individualmente e a incorporação resulta em um sinal leve que é medido. Um sinal leve indica a presença da sequência de inserção/flanqueamento do transgene devido à amplificação, hibridação, e extensão de base simples ou múltiplas bem sucedidas.

[0046] Polarização da fluorescência como descrita por Chen, et al., (Genoma Res. 9:492-498, 1999) é um método que pode ser usado para detectar o amplicon da presente invenção. Usando este método um

oligonucleotídeo é projetado que sobrepõe o flanqueamento genômico e a junção de DNA inserida. O oligonucleotídeo é hibridado com produto de PCR unifilamentar da região de interesse (um iniciador no DNA inserido e um na sequência de DNA genômica de flanqueamento) e incubado na presença de uma DNA polimerase e um ddNTP fluorescente-marcado. Extensão de base simples resulta na incorporação do ddNTP. Incorporação pode ser medida como uma alteração na polarização usando um fluorímetro. Uma alteração na polarização indica a presença da sequência de inserção/flanqueamento do transgene devido à amplificação, hibridação, e extensão de base simples bem sucedidas.

[0047] Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) é descrito como um método de detectar e quantificar a presença de uma sequência de DNA e é inteiramente entendido nas instruções fornecidas pelo fabricante. Brevemente, uma sonda de oligonucleotídeo de FRET é projetada que sobrepõe o flanqueamento genômico e junção de DNA inserida. A sonda de FRET e iniciadores de PCR (um iniciador na sequência de DNA inserida e um na sequência genômica de flanqueamento) são ciclizados na presença de uma polimerase termoestável e dNTPs. Hibridação da sonda de FRET resulta na clivagem e liberação da metade fluorescente longe da metade de extinção na sonda de FRET. Um sinal fluorescente indica a presença da sequência de inserção de flanqueamento/transgene devido à amplificação e hibridação bem sucedidas.

[0048] Balizas moleculares foram descritas para o uso na sequência como descrito em Tyangi, et al. (Nature Biotech.14:303-308, 1996). Brevemente, uma sonda de oligonucleotídeo de FRET é projetada que sobrepõe a junção de DNA genômico de flanqueamento e inserida. A única estrutura da sonda de FRET resulta nela contendo a estrutura secundária que mantém as metades fluorescentes e de extinção em

proximidade íntima. A sonda de FRET e iniciadores de PCR (um iniciador na sequência de DNA inserida e um na sequência genômica de flanqueamento) são ciclizadas na presença de uma polimerase termoestável e dNTPs. Seguindo amplificação de PCR bem sucedida, hibridação da sonda de FRET com a sequência alvo resulta na remoção da estrutura secundária da sonda e separação espacial das metades fluorescentes e de extinção que resulta na produção de um sinal fluorescente. O sinal fluorescente indica a presença da sequência de inserção de flanqueamento/transgene devido à amplificação e hibridação bem sucedidas.

[0049] Outros métodos descritos, tais como, microfluídicos (pub. de patente US 2006068398, patente US Nº 6.544.734) fornecem métodos e dispositivos para separar e amplificar as amostras de DNA. Tinturas ópticas usadas para detectar e quantificar as moléculas de DNA específicas (WO/05017181). Dispositivos de nanotubo (WO/06024023) que compreende um sensor eletrônico para a detecção das moléculas de DNA ou nanocontas que ligam as moléculas de DNA específicas e podem depois ser detectadas.

[0050] Kits de detecção de DNA são fornecidos usando as composições descritas aqui. Os kits são úteis para a identificação de DNA do evento de milho MON89034 em uma amostra e podem ser aplicados pelo menos para métodos para geneticamente melhorar plantas de milho contendo o DNA apropriado do evento. Os kits contêm iniciadores e/ou sondas de DNA que são homólogos ou complementares aos segmentos selecionados das sequências como expostas na SEQ ID Nº: 1-7, ou iniciadores ou sondas de DNA homólogos ou complementares ao DNA contido nos elementos genéticos de DNA do transgene como expostos na Listagem de Sequência. Estas sequências de DNA podem ser usadas nas reações de amplificação de DNA ou como sondas em um método de hibridação de DNA para detectar a presença de

polinucleotídeos diagnósticos para a presença do DNA alvo em uma amostra. A produção de um amplicon pré-definido em uma reação de amplificação térmica é diagnóstico para a presença de DNA que corresponde ao DNA do genoma de PTA-7455 na amostra. Se hibridação for selecionada, a detecção da hibridação da sonda para a amostra biológica é diagnóstico para a presença do DNA do evento transgênico MON89034 na amostra. Tipicamente, a amostra é milho, ou produtos de milho ou subprodutos do uso de milho.

[0051] A presente invenção fornece uma planta de milho transgênica designada como evento de milho MON89034, progênie da planta, e células da planta, como também semente produzida da planta. Semente representativa para cultivar a planta, para produzir progênie, para obter células, ou para produzir uma plantação da dita semente compreendendo o evento de milho transgênico foi depositada em 28 de março de 2006 junto à American Type Culture Collection (ATCC) e tem o número de acesso PTA-7455.

[0052] A planta e células e produtos produzidos destas modalidades e outros contêm DNA que é diagnóstico para a presença de DNA derivada de qualquer célula derivada do evento de milho transgênico MON89034 em qualquer amostra biológica. Isto é porque estas duas sequências novas estão contidas dentro das células do evento de milho transgênico MON89034. O DNA diagnóstico compreende uma sequência de nucleotídeo que é selecionada do grupo que consiste na SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, e SEQ ID N°: 5. A relação destas sequências é descrita mais particularmente aqui e na legenda para a Figura 1 e com referência à Figura 1.

[0053] Plantas de milho crescidas de semente que são homozigotos para o DNA diagnóstico para evento de milho transgênico MON89034 estão também dentro do escopo da presente invenção. Plantas de milho crescidas de semente que são heterozigotos para o

DNA diagnóstico para evento de milho transgênico MON89034 estão também dentro do escopo da presente invenção desde que estas semente também compreendam as sequências de DNA diagnóstico. Células, semente, e tecido produzidos de tais plantas compreendendo o DNA diagnóstico estão também dentro do escopo da presente invenção.

[0054] Plantas de milho e células de planta de milho e outros compreendendo o DNA diagnóstico para o evento de milho transgênico MON89034 exibem resistência à infestação de insetos lepidópteros. Estas células e plantas contêm DNA que codifica a proteína inseticida (agente inseticida, tóxico) Cry2Ab e DNA tendo sequências de nucleotídeo da SEQ ID Nº: 1 e SEQ ID Nº: 2 que formam uma parte do genoma das células da planta. Estas plantas e células da planta também contêm um DNA que codifica a proteína inseticida (agente inseticida, tóxico) Cry1A.105. Estas proteínas podem ser referidas como uma primeira e uma segunda proteína inseticida, respectivamente ou no inverso. Expressão destas proteínas é alcançada dos componentes reguladores/elementos genéticos que estão embutidos dentro dos cassetes de expressão que fornecem a expressão de cada uma das sequências de DNA que codifica estas toxinas e são descritos completamente aqui e na legenda para a Figura 1 e com referência à Figura 1 e a sequência como exposta na SEQ ID Nº: 5. Plantas de milho e células da planta de milho compreendendo estas sequências são eficazes para proteger plantas de infestação de peste lepidóptero, ou heterozigoto ou homozigoto para os alelos nos quais estas sequências de codificação estão presentes.

[0055] A presente invenção também fornece amplicons que pode ser produzidos das sequências descritas aqui que são diagnóstico para a presença em uma amostra biológica de DNA derivada de DNA do evento de milho transgênico MON89034. Um amplicon diagnóstico pa-

ra a presença de DNA transgênico do evento de milho MON89034 em uma amostra biológica contém pelo menos um segmento de polinucleotídeo que consiste na sequência de nucleotídeo como exposta na SEQ ID N<sup>º</sup>: 1 ou SEQ ID N<sup>º</sup>: 2. Estes amplicons podem ser produzidos usando sequências de iniciador como descritas aqui abaixo de qualquer amostra biológica contendo pelo menos cerca de 0,5 femto-mole ou cerca de 0,5 pico-grama de DNA derivado do evento de milho transgênico MON89034. Tais fontes de amostra biológica de DNA que correspondem ao evento de milho transgênico MON89034 podem ser fubá, óleo de milho, bolo de milho, semente de milho, germe de milho, amido de milho, e farinha de milho e outras derivadas daquele evento transgênico.

[0056] A invenção também fornece moléculas de polinucleotídeo isoladas tais como as que exibem sequências de nucleotídeo contíguas como aquelas expostas na SEQ ID N<sup>º</sup>: 5. Estas sequências de nucleotídeo contíguas compreendem: (1) de cerca de 11 a cerca de 12000 nucleotídeos e qualquer comprimento entre este, e também compreendem os nucleotídeos contíguos como expostos na posição de nucleotídeo 1-11 ou 9-20 na SEQ ID N<sup>º</sup>: 1 e 1-11 ou 9-20 como expostos na SEQ ID N<sup>º</sup>: 2; (2) qualquer sequência de nucleotídeo contíguo como exposta na SEQ ID N<sup>º</sup>: 3 de cerca de 11 a cerca de 2000 nucleotídeos e qualquer comprimento entre este, e também compreendem os nucleotídeos contíguos como expostos na posição de nucleotídeo 1-11 e 9-20 como expostos na SEQ ID N<sup>º</sup>: 1; qualquer sequência de nucleotídeo contíguo como exposta na SEQ ID N<sup>º</sup>: 4 de cerca de 11 a cerca de 914 nucleotídeos e qualquer comprimento entre este, e também compreende os nucleotídeos contíguos como expostos na posição de nucleotídeo 1-11 e 9-20 como expostos na SEQ ID N<sup>º</sup>: 2. Estas moléculas de polinucleotídeo isoladas são úteis no método de amplificação de DNAs para produzir um ou mais amplicons de

uma amostra biológica contendo DNA de milho. A detecção de um tal amplicon é diagnóstico para a presença de DNA do evento de milho transgênico MON89034 na amostra. As moléculas de polinucleotídeo isoladas são também úteis em vários métodos de detecção de nucleotídeo para detectar a presença de DNA derivado do evento de milho transgênico MON89034 em uma amostra biológica. Em particular, sondas de polinucleotídeo compreendendo pelo menos cerca de 11 nucleotídeos contíguos como expostos na SEQ ID N°: 1 ou SEQ ID N°: 2 são úteis como sondas em tais métodos para detectar o DNA do evento transgênico MON89034 em uma amostra. As sequências complementares destas moléculas de polinucleotídeo isoladas são também úteis nos mesmos métodos de detecção e/ou de amplificação.

[0057] Kits para o uso na detecção da presença de DNA derivado do evento de milho transgênico MON89034 em uma amostra biológica são também fornecidos pela presente invenção. Um kit usa uma molécula de polinucleotídeo de sonda, a molécula de sonda contendo pelo menos de cerca de 11 a cerca de 12000 nucleotídeos contíguos que exibem homologia substancial, ou exibem complementaridade substancial a um segmento de nucleotídeo compreendendo uma sequência como exposta na SEQ ID N°: 5, seria útil para detectar a presença de DNA de MON89034 em uma amostra. A molécula de sonda deveria conter pelo menos uma das sequências como expostas na SEQ ID N°: 1 e SEQ ID N°: 2. As sequências expostas na SEQ ID N°: 1 e SEQ ID N°: 2 podem também ser referidas como sequências de junção, isto é, as sequências em qualquer terminação do DNA transgênico inserido na planta de milho para dar origem ao evento de milho transgênico MON89034. Estas sequências, arbitrariamente referidas como terminações 5' e 3' respectivamente, contêm parte da sequência de DNA inserida e parte da sequência de genoma de milho de flanqueamento. Por exemplo, SEQ ID N°: 1 representa em sua metade 5' o término 3'

da terminação de genoma de milho flanqueando a terminação 5' do DNA inserido, a terminação 5' do DNA inserido sendo representada pela metade da terminação 3' da sequência como exposta na SEQ ID N<sup>º</sup>: 1. SEQ ID N<sup>º</sup>: 2 representa em sua metade de 5' os términos 3' da terminação do DNA inserido, e em sua metade da 3' os términos 5' da terminação da sequência de genoma de milho flanqueando a terminação 3' do DNA inserido. No genoma de milho de ocorrência natural na posição da sequência inserida exposta na SEQ ID N<sup>º</sup>: 5, a sequência de flanqueamento na terminação 5' do DNA inserido e a sequência de flanqueamento na terminação 3' do DNA inserido são unidas, e uma primeira molécula de iniciador que hibridar com a sequência complementar à sequência exposta na SEQ ID N<sup>º</sup>: 3 (diferente dos 21 nucleotídeos da terminação 3' da SEQ ID N<sup>º</sup>: 3) e uma segunda molécula de iniciador que hibridar com a sequência como exposta na SEQ ID N<sup>º</sup>: 4 (diferente dos 20 nucleotídeos da terminação 5' da SEQ ID N<sup>º</sup>: 4) produzirá um amplicon em uma reação de amplificação térmica com modelo que é DNA diferente do DNA de MON89034 que é diagnóstico para a ausência do DNA inserido em MON89034, e os mesmos iniciadores produzirão um amplicon que é ligeiramente maior que 12000 nucleotídeos (dependendo da posição dos iniciadores nas sequências de flanqueamento expostas na SEQ ID N<sup>º</sup>: 3 e SEQ ID N<sup>º</sup>: 4) quando usando DNA de MON89034 como um modelo. Outras modalidades são também fornecidas.

[0058] Um kit para detectar a sequência de junção SEQ ID N<sup>º</sup>: 1 ou SEQ ID N<sup>º</sup>: 2 do evento de milho MON89034 em uma amostra biológica é fornecido. O kit contém uma sonda de polinucleotídeo que é ou é completamente complementar a uma sequência selecionada do grupo que consiste na SEQ ID N<sup>º</sup>: 1 ou SEQ ID N<sup>º</sup>: 2 ou complementos das mesmas, e também contém um par de iniciadores para uso em uma reação de amplificação de ácido nucléico. O par de iniciadores

pode ser referido como um primeiro iniciador consistindo em pelo menos cerca de 15 a cerca de 50 nucleotídeos contíguos da porção de genoma de milho da SEQ ID N°: 3 e um segundo iniciador que consiste em pelo menos cerca de 15 a cerca de 50 nucleotídeos contíguos complementares à porção de DNA inserido heterólogo da SEQ ID N°: 5. O primeiro iniciador do par de iniciadores de polinucleotídeo especificamente hibrida com a sequência de complemento reversa que corresponde à exposta na SEQ ID N°: 3 de cerca da posição de nucleotídeo 1 a cerca da posição 2050 e o segundo iniciador do dito par de iniciadores de polinucleotídeo especificamente hibrida com a sequência como exposta na SEQ ID N°: 5 de cerca da posição de nucleotídeo 2060 a cerca da posição de nucleotídeo 12.208, e são estendidas uma em direção à outra para formar um amplicon compreendendo a SEQ ID N°: 1, o dito amplicon sendo diagnóstico para a presença de DNA do evento de MON89034 na amostra. Um par diferente de iniciadores pode ser referido como um primeiro iniciador consistindo em pelo menos cerca de 15 a cerca de 50 nucleotídeos contíguos complementares à porção do genoma de milho da SEQ ID N°: 4 e um segundo iniciador que consiste em pelo menos cerca de 15 a cerca de 50 nucleotídeos contíguos da porção de DNA inserido heterólogo da SEQ ID N°: 5. O segundo iniciador do par de iniciadores de polinucleotídeo especificamente hibrida com a sequência de complemento reversa que corresponde à exposta na SEQ ID N°: 5 de cerca da posição de nucleotídeo 1 a cerca da posição 11305 e o primeiro iniciador do par de iniciadores de polinucleotídeo especificamente hibrida com a sequência como exposta na SEQ ID N°: 4 de cerca da posição de nucleotídeo 21 a cerca da posição de nucleotídeo 914, e são estendidas uma em direção à outra para formar um amplicon compreendendo a SEQ ID N°: 2, o dito amplicon sendo diagnóstico para a presença de DNA do evento de MON89034 na dita amostra.

[0059] Estes pares de iniciador são úteis em produzir amplicons compreendendo ou SEQ ID N<sup>º</sup>: 1 ou SEQ ID N<sup>º</sup>: 2, como pode ser o caso, e são desse modo diagnóstico para a presença de DNA de MON89034 em uma amostra biológica. Estes amplicons permitem a detecção da presença de uma sequência de junção diagnóstico do evento de milho MON89034 em uma amostra biológica.

[0060] Um método para produzir e detectar um amplicon que é diagnóstico para um DNA do evento de milho transgênico MON89034 em uma amostra biológica compreendendo DNA de milho é também fornecido. O método compreende contatar a amostra biológica junto com dois ou mais iniciadores em uma reação de amplificação de ácido nucléico, executar uma reação de amplificação de ácido nucléico, depois detectar o amplicon. A presença do amplicon é diagnóstico para o dito DNA do evento na amostra desde que o amplicon contenha pelo menos uma das sequências contíguas como expostas na SEQ ID N<sup>º</sup>: 1 e SEQ ID N<sup>º</sup>: 2, de cerca da posição de nucleotídeo 1 - 11 ou 9-20, ou as sequências complementares que correspondem a estas posições.

[0061] As sequências de nucleotídeo diagnóstico para a presença de evento de milho transgênico MON89034 em uma amostra biológica podem também ser detectadas usando outros métodos. Por exemplo, contatando uma amostra biológica suspeita de conter DNA de MON89034 com uma sonda que hibrida sob condições de hibridação rigorosa com uma ou mais das sequências de nucleotídeo como expostas na SEQ ID N<sup>º</sup>: 1 ou SEQ ID N<sup>º</sup>: 2, submetendo a amostra e sonda às condições de hibridação rigorosa; e depois detectando a hibridação da sonda para a sequência de nucleotídeo. Detecção da hibridação é diagnóstico para a presença do DNA de MON89034 na amostra.

[0062] Polinucleotídeos iniciadores para o uso na produção, em uma reação de amplificação térmica, de um amplicon que é diagnósti-

co para a presença de DNA do evento de milho MON89034 em uma amostra biológica são também fornecidos pela presente invenção. Tipicamente, os iniciadores são fornecidos em pares, os membros do par de iniciadores sendo referido para conveniência como um primeiro iniciador e um segundo iniciador. Um primeiro iniciador pode consistir em pelo menos cerca de 15 nucleotídeos contíguos da porção de genoma de milho como exposto na SEQ ID N<sup>º</sup>: 3 e um segundo iniciador pode consistir em pelo menos cerca de 15 nucleotídeos contíguos complementares à porção de DNA inserido heterólogo como exposta na SEQ ID N<sup>º</sup>: 5. Estes dois iniciadores produziriam um amplicon em uma reação de amplificação térmica com DNA modelo obtido do evento do DNA do evento de milho MON89034 contendo uma sequência de polinucleotídeo como exposta na SEQ ID N<sup>º</sup>: 1. Alternativamente, um primeiro iniciador pode consistir em pelo menos cerca de 15 nucleotídeos contíguos da porção de genoma de milho da SEQ ID N<sup>º</sup>: 4, e um segundo iniciador pode consistir em pelo menos cerca de 15 nucleotídeos contíguos complementares à porção de DNA inserido heterólogo da SEQ ID N<sup>º</sup>: 5. Estes dois iniciadores produziriam um amplicon em uma reação de amplificação térmica com DNA modelo obtido do DNA do evento de milho MON89034 contendo uma sequência de polinucleotídeo como exposta na SEQ ID N<sup>º</sup>: 2.

[0063] Um método alternativo para detectar uma sequência de junção do evento de milho MON89034 em uma amostra biológica compreendendo DNA de milho, tal como SEQ ID N<sup>º</sup>: 1 ou SEQ ID N<sup>º</sup>: 2, consiste em contatar a amostra com uma sonda de polinucleotídeo que hibrida sob condições de hibridação rigorosa com uma das sequências de junção, submeter a amostra e sonda às condições de hibridação rigorosa; e detectar a hibridação da sonda para a sequência de junção. Detecção da ligação/hibridização da sonda à sequência de junção é indicativo da presença do DNA de MON89034 na amostra

biológica. Uma planta de milho estavelmente transformada, o DNA desta produz um amplicon de DNA compreendendo a SEQ ID Nº: 1 ou SEQ ID Nº: 2 quando submetida ao método exposto aqui, está dentro do escopo da presente invenção. Sequências de iniciador exemplares, em particular, um par de sequências de iniciador, são expostas aqui nos exemplos e na SEQ ID Nº: 6 e SEQ ID Nº: 7.

[0064] Um método alternativo de detectar a presença de DNA do evento de milho MON89034 em uma amostra biológica pode consistir nas etapas de contatar a amostra com uma sonda que hibrida sob condições de hibridação rigorosa com DNA de MON89034 e não hibrida sob condições de hibridação rigorosa com DNA genômico da planta de milho que não seja o DNA de MON89034, submeter a amostra e sonda às condições de hibridação rigorosa, e depois detectar a hibridação da sonda com o DNA de MON89034. Uma sonda consistente com esta modalidade é ou é complementar a uma sequência selecionada do grupo que consiste na SEQ ID Nº: 1 e SEQ ID Nº: 2. Detecção da hibridação da sonda para a amostra é diagnóstico para a presença do polinucleotídeo do evento de milho MON89034 na amostra. A amostra biológica pode ser qualquer amostra contendo DNA de MON89034 incluindo mas não limitada a óleo de milho, fubá, farinha de milho, glúten de milho, bolos de milho, amido de milho, água de maceração de milho, tecido de milho, células de milho, grão de milho, pólen de milho, tecido de raiz de milho, DDGS, e mesmo etanol produzido como um subproduto da fermentação de tal milho transgênico desde que contenha a amostra de pelo menos uma quantidade detectável de um polinucleotídeo diagnóstico para a presença do evento de MON89034 na amostra. Uma sonda de polinucleotídeo pode ser qualquer nucleotídeo selecionado do grupo que consiste em um ácido desoxirribonucléico, um ácido ribonucléico, e um análogo de nucleotídeo, e pode ser marcado com pelo menos uns fluoróforos, molécula con-

tendo um isótopo de emissão de rádio, ou uma molécula de tipo hapteno que pode ser especificamente detectada com um anticorpo ou outra reação do tipo de ligação.

[0065] Uma variedade de milho compreendendo um DNA diagnóstico para a presença de um DNA de evento transgênico MON89034 pode ser obtida desenvolvendo uma planta de milho compreendendo DNA do evento de milho transgênico MON89034 junto com uma planta de milho diferente de evento MON89034 para produzir uma planta de milho híbrida compreendendo o DNA diagnóstico para o dito evento. Uma tal planta de milho híbrida compreendendo o DNA diagnóstico para o evento de milho transgênico MON89034 está dentro do escopo da presente invenção, como são semente produzida do híbrido (desde que compreenda o DNA diagnóstico para evento de milho transgênico MON89034), e pólen, óvulo, semente, raízes, ou folhas da planta de milho híbrido MON89034, também à medida que estas contenham as sequências de DNA diagnóstico, e progênie produzida de tais modalidades.

[0066] A presente invenção fornece um método para proteger uma planta de milho de infestação de insetos lepidópteros compreendendo fornecer na dieta de um peste de inseto lepidóptero alvo uma ou mais células de planta de milho transgênica, cada célula de planta de milho compreendendo em seu genoma um polinucleotídeo que corresponde à sequência como exposta em ambas as SEQ ID N°: 1 e SEQ ID N°: 2 e a sequência de nucleotídeo contígua como exposta na SEQ ID N°: 5 entre SEQ ID N°: 1 e SEQ ID N°: 2. O inseto lepidóptero alvo que alimenta em tais células de planta de milho transgênica é inibido de outra alimentação na planta de milho da qual as células de planta de milho são derivadas.

[0067] Composições são também fornecidas pela presente invenção que são tóxicas para alvejar pestes lepidópteros de plantas de mi-

Iho. Uma composição de células de planta transgênica fornecida na dieta de uma peste de inseto lepidóptero alvo em que cada célula de planta de milho transgênica compreende em seu genoma um polinucleotídeo correspondendo à sequência como exposta em ambas as SEQ ID N°: 1 e SEQ ID N°: 2, junto com a sequência de nucleotídeo contígua como exposta na SEQ ID N°: 5 entre SEQ ID N°: 1 e SEQ ID N°: 2, é eficaz para fornecer proteção contra infestação de insetos lepidópteros para uma planta de milho ou célula de planta de milho, desde que a planta de milho ou célula esteja expressando Cry1A.105 e/ou Cry2Ab2 dos cassetes de expressão contidos dentro da sequência de nucleotídeo contígua. Tais composições, na forma de semente de milho transgênico, foram depositadas junto à American Type Culture Collection sob número de acesso PTA-7455. Tais plantas de milho resistentes a insetos, ou partes das mesmas, conterão o DNA no genoma das células de tal planta tendo pelo menos uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste na SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, e SEQ ID N°: 5. Progênie e semente da planta de milho resistente a inseto em que a progênie e semente têm as sequências diagnósticas referidas aqui, estão também inclusas dentro do escopo da presente invenção. Tais plantas de milho resistentes a insetos podem ser produzidas por um método compreendendo cruzar um evento da planta de milho transgênica MON89034 com uma planta de milho diferente, e selecionando a progênie resistente a inseto analisando pelo menos uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo que consiste na SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4 e SEQ ID N°: 5.

[0068] O evento de milho transgênico resistente a insetos MON89034 pode ser combinado com outras variedades transgênicas de milho, tais como milho resistente a herbicidas tais como glifosato, glufosinato, e diacamba, e outros, ou milho resistente a insetos devo-

radores de raiz como resultado da inserção das sequências que codificam as proteínas tais como PS149Bl e Cry3Bb modificado, ou outras variedades de milho transgênico resistente à infestação de insetos lepidópteros como resultado da inserção das sequências que codificam outras proteínas de toxina tais como VIP3A, Cry1Ab, e Cry1Fa e outros. Várias combinações de todos estes eventos transgênicos diferentes são desenvolvidas juntamente com as plantas de milho da presente invenção, isto é, o evento de MON89034, para fornecer variedades melhoradas de milho transgênico híbrido resistente à infestação de coleópteros e lepidópteros, e resistente a herbicidas seletivos. Tal exibição de variedades melhorou as características de rendimento e de tolerância à seca comparadas às variedades transgênicas de traço não-transgênico e individuais.

[0069] Um método de produzir uma planta de milho resistente à infestação de inseto é fornecido, em que a planta de milho compreende uma quantidade inseticidamente eficaz das sequências de codificação de toxina como expostas na SEQ ID Nº: 5. O método compreende extrair as sequências de codificação de toxina do evento de milho transgênico MON89034 e introduzir estas sequências de codificação, sozinhas ou juntas, em uma ou mais células de milho, para produzir células de milho transgênico compreendendo estas uma ou mais sequências de codificação de toxina. As células de milho transgênico são depois crescidas (regeneradas) em plantas de milho transgênicas compreendendo a uma ou mais sequências de codificação, e as plantas transgênicas depois exibindo resistência à infestação de insetos.

[0070] Um método para determinar a zigosidade do DNA de uma planta de milho transgênica compreendendo DNA do evento de milho MON89034, com respeito ao DNA que é diagnóstico para a presença de tal DNA de MON89034 em uma amostra biológica, é fornecido pela presente invenção. O método consiste em, como uma primeira etapa,

contatar a amostra com três iniciadores diferentes compreendendo SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, e SEQ ID N°: 10, que quando usada junto em uma reação de amplificação de ácido nucléico compreendendo DNA do evento de milho MON89034, produz um primeiro amplicon que é diagnóstico para o evento de milho MON89034, e quando usado em uma reação de amplificação de ácido nucléico compreendendo DNA de milho genômico diferente de DNA de MON89034, produz um segundo amplicon que é diagnóstico para DNA de milho genômico diferente de DNA de MON89034. As etapas a seguir consistem em executar uma reação de amplificação de ácido nucléico, e comparar os amplicons produzidos durante a reação de amplificação térmica. Detecção da presença de ambos os amplicons é diagnóstico da zigosidade da amostra. Detecção apenas do primeiro amplicon é indicativo da amostra contendo apenas DNA de MON89034, isto é, uma amostra homozigota. Detecção apenas do segundo amplicon é indicativo da amostra não contendo nenhum DNA de MON89034. Detecção de ambos os primeiro e segundo amplicons junto em uma amostra é indicativo de uma amostra contendo (1) DNA heterozigoto com referência a uma amostra pura contendo apenas material de partida heterozigoto, ou (2) uma amostra contendo DNA's de amostra de partida tanto homozigoto como heterozigoto, ou (3) uma amostra contendo um pouco da combinação de homozigoto, heterozigoto, e/ou amostras diferentes de DNA de MON89034.

[0071] A invenção também fornece cultivar plantas de milho compreendendo o DNA diagnóstico para um segmento de DNA transgênico inserido no genoma das células das plantas de milho. O DNA no genoma das células de milho compreende qualquer uma ou todas as sequências selecionadas do grupo que consiste em: (a) a sequência de nucleotídeo como exposta na SEQ ID N°: 5; (b) ambas as sequências de nucleotídeo como expostas na SEQ ID N°: 1 e SEQ ID N°: 2;

(c) a sequência de nucleotídeo como exposta na SEQ ID N<sup>º</sup>: 3; e (d) a sequência de nucleotídeo como exposta na SEQ ID N<sup>º</sup>: 4.

[0072] Os exemplos a seguir são incluídos para demonstrar exemplos de certas modalidades preferidas da invenção. Deveria ser apreciado por aqueles de habilidade na técnica que as técnicas descritas nos exemplos que seguem representam métodos que os inventores descobriram para bom funcionamento na prática da invenção, e desse modo podem ser considerados constituírem exemplos de modos preferidos para sua prática. Porém, aqueles de habilidade na técnica devem, levando em conta a descrição presente, apreciar que muitas alterações podem ser feitas nas modalidades específicas que são descritas e ainda obter um resultado igual ou similar sem divergir do espírito e escopo da invenção.

## EXEMPLOS

### EXEMPLO 1

[0073] Este Exemplo ilustra a construção e caracterização molecular do evento de milho transgênico MON89034.

[0074] A planta de milho MON89034 foi produzida por um processo de transformação mediado por Agrobacterium de uma linha de milho congênita com a construção de plasmídeo pMON38850 (o cassete de expressão é mostrado na Figura 1). O método de transformação usado é similar ao descrito na patente US No. 6.603.061. A construção de plasmídeo pMON38850 contém os cassetes de expressão da planta ligados com os elementos genéticos reguladores necessários para a expressão da proteína inseticida Cry1A.105 em células de planta de milho. As células de milho foram regeneradas nas plantas de milho intactas consistindo em pelo menos cerca de 23.000 eventos transgênicos diferentes. Eventos transgênicos individuais (plantas) foram selecionados da população de eventos mostrando integridade dos cassetes de expressão da planta e resistência ao dano de alimentação por

larvas de insetos Lepidópteros. Uma planta de milho contendo em seu genoma os cassetes de expressão da planta ligados de pMON38850 é um aspecto da presente invenção. Após análise substancial destes eventos transgênicos, o evento transgênico MON89034 foi selecionado em base de sua caracterização molecular e a ausência de qualquer efeito de deficiência fenotípica ou agronômica indesejável.

[0075] As sequências dos elementos genéticos de transgene contidas no genoma de milho de MON89034 como ilustrado na Figura 1 consistem nos elementos a seguir cada em ligação operável um com o outro. Primeiro na terminação 5' arbitrariamente definida da sequência (isto é, próximo à porção central esquerda do segmento descrito na Figura 1) é marcada uma porção da região de borda direita (RB) de *Agrobacterium tumefaciens*. Este é seguido em sequência por um cassette de expressão que consiste em um elemento de promotor de CaMV 35S intensificado (aqui referido como P-CaMV35Sen, localizado nas posições 2350 a 2651 na SEQ ID N°: 5); uma sequência líder não-transladada da proteína ligadora A/B de clorofila de trigo (aqui referida como L-Ta.lhcbl, localizada nas posições 2678 a 2738 na SEQ ID N°: 5); uma sequência de ítron de actina de arroz (aqui referida como L-Os.Actl, localizada nas posições 2755 a 3234 na SEQ ID N°: 5); uma sequência de ocorrência não-natural codificando o gene quimérico Cry1A.105 (localizada nas posições 3244 a 6777 na SEQ ID N°: 5); e uma região de terminação 3' de trigo (aqui referida como T-Ta.Hspl7-I:I:I, localizada nas posições 6809 a 7018 na SEQ ID N°: 5). A combinação dos elementos acima referidos, diferente da sequência da borda, funciona junto quando em uma planta de milho para causar a expressão da proteína inseticida de Cry1A.105. Estes elementos são depois ligados em sequência a outro cassette de expressão que consiste nos elementos a seguir: um promotor do mosaico de escrofulária (localizado nas posições 7086 a 7649 na SEQ ID N°: 5), um líder de Hsp70

de *Zea mays* (aqui referido como HSP70 ou L-Hsp70, localizado nas posições 7672 a 8475 na SEQ ID N°: 5), e uma sequência de codificação de peptídeo de trânsito de cloroplasto (aqui referida como CTP2 ou TS-SSU-CTP, localizada nas posições 8492 a 8892 na SEQ ID N°: 5). Estes segmentos operavelmente ligados são depois ligados a uma sequência de nucleotídeo que codifica a proteína inseticida Cry2Ab (localizada nas posições 8893 a 10800 na SEQ ID N°: 5) que está ligada em sua terminação 3' a uma região não-transladada de 3' do gene da nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens* (aqui referido como T-AGRtu.nos-1:1:13, localizado nas posições 10827 a 11377 na SEQ ID N°: 5). Estes elementos flanqueando a sequência de codificação de Cry2Ab juntos funcionam para direcionar a expressão de Cry2Ab quando presente em uma planta de milho. O cassete de expressão de Cry2Ab é depois seguido em sequência por uma sequência de nucleotídeo que consiste em uma porção suficiente da região da borda esquerda (LB) de *Agrobacterium tumefaciens*.

[0076] Moléculas de DNA úteis como iniciadores em métodos de amplificação de DNA podem ser derivadas das sequências dos elementos genéticos da inserção do transgene contida no evento de MON89034. Estas moléculas de iniciador podem ser usadas como parte de um conjunto de iniciador que também inclui uma molécula de iniciador de DNA derivada do genoma do evento flanqueando a inserção do transgene.

[0077] A porção do DNA do plasmídeo pMON38850 inserido no genoma de milho, dando origem ao evento de planta de milho transgênica MON89034, consistindo nos segmentos das bordas esquerda e direita e os dois cassetes de expressão da planta ligados (um primeiro cassete de expressão codificando Cry1A.105, e um segundo cassete de expressão codificando Cry2Ab, em que cada cassete pode ser alternável sobre um se for designado como sendo um primeiro ou um

segundo cassete) entre os segmentos da borda foi caracterizado por análises moleculares detalhadas. Estas análises foram conduzidas para identificar eventos que continham apenas um segmento inserido simples e intacto que consiste nas bordas e nos dois cassetes de expressão desejados entre as bordas (número de sítios de integração dentro do genoma de milho), no número de cópias (o número de cópias do T-DNA dentro de um locus), e na integridade dos cassetes de gene inseridos (isto é, ausência de qualquer rearranjo ou variação de sequência da sequência conhecida estar presente no plasmídeo pMON38850). Sondas moleculares de DNA foram usadas que incluíram a região de codificação de Cry1A.105 intacta e seus respectivos elementos reguladores, os promotores, íntrons, e sequências de poliadenilação dos cassetes de expressão da planta, e a região de DNA da cadeia principal do plasmídeo pMON38850. Os dados obtidos das análises de todos os eventos demonstraram que MON89034 contém uma inserção de T-DNA simples com uma cópia do cassete de expressão de Cry1A.105. Nenhum elemento adicional do vetor de transformação pMON38850, ligado ou não-ligado aos cassetes de genes intactos, foi detectado no genoma de MON89034. Por fim, análises de sequência de PCR e de DNA foram executadas para determinar as junções do genoma de inserção-à-planta de 5' e 3', que confirmam a organização dos elementos dentro da inserção (vide por exemplo, Figura 1), e determinam a sequência completa do DNA inserido no genoma da planta de milho que deu origem ao evento de milho transgênico MON89034. A sequência inserida completa, junto com uma porção das sequências de flanqueamento do genoma de milho em qualquer terminação do DNA inserido, é descrita na sequência como exposta na SEQ ID Nº: 5.

[0078] DNA genômico de MON89034, e DNA não-transgênico de milho diferente de MON89034 (DNA de controle) foi extraído da se-

mente de milho primeiro processando a semente (até 200 sementes) para um pó fino em um agitador de tinta Harbil 5G-HD (Habil Inc, Cincinnati, Ohio). Brevemente, a semente em pó foi extraída em tampão de extração (EM Science Cat. Nº 3700, EM Science, Gibbstown, Nova Jersey, USA) e o DNA precipitado da solução com isopropanol (Sigma Cat. Nº 1-0398, Sigma, St., Louis, MO, USA). O DNA precipitado foi enrolado em carretel em um tubo de microcentrífuga contendo 70 por cento de etanol. O DNA foi empelotado em uma microcentrífuga em velocidade máxima (~14,000 rpm) durante ~5 minutos, secado a vácuo, e redissolvido em tampão de TE (pH 8,0). O DNA foi depois armazenado em um refrigerador de 4°C. Este método pode ser modificado por alguém versado na técnica para extraír o DNA de uma semente de milho simples.

[0079] Métodos exemplares usados para identificar o evento MON89034 em uma amostra são descritos em um ponto terminal específico para evento Taqman PCR para o qual exemplos de condições são descritos na Tabela 1 e Tabela 2. Os iniciadores de DNA usados no ensaio são iniciadores SQ2842 (SEQ ID Nº: 6), SQ2843 (SEQ ID Nº: 7), iniciador marcado 6FAM® PB880 (SEQ ID Nº: 14) e iniciador marcado VIC® PB2931 (SEQ ID Nº: 15), 6FAM e VIC são produtos de tintura fluorescente de Applied Biosystems (Foster City, CA) ligados aos iniciadores de DNA. Para sondas de MGB de Taqman, a atividade de 5'-exonuclease de Taq DNA polimerase cliva a sonda da terminação 5', entre o fluoróforo e extintor. Quando hibridada com o filamento de DNA alvo, o extintor e o fluoróforo são suficientemente separados em espaço tridimensional para produzir um sinal fluorescente (comprimento de onda de excitação de fluoróforo).

[0080] SQ2842 (SEQ ID Nº: 6), e SQ2843 (SEQ ID Nº: 7), quando usado nestes métodos de reação com PB880 (SEQ ID Nº: 14) produzem um amplicon de DNA que é diagnóstico para o DNA do evento

MON89034. Os controles para esta análise deveriam incluir um controle positivo de milho contendo o DNA do evento MON89034, um controle negativo de milho não-transgênico ou de milho transgênico diferente do evento MON89034, e um controle negativo não contendo nenhum DNA modelo.

[0081] SQ1564 (SEQ ID N°: 17) e SQ1565 (SEQ ID N°: 18) quando usados nestes métodos de reação com PB351 (SEQ ID N°: 21) produzem um amplicon que é diagnóstico de Cry1A.105 em MON89034.

[0082] Estes ensaios são otimizados para o uso com Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 ou Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, ou termociclizador de Eppendorf Mastercycler Gradiente. Outros métodos e aparelho conhecidos àqueles versados na técnica que produzem amplicons que identificam o DNA do evento MON89034 alvo estão dentro da habilidade da técnica.

[0083] Qualquer sonda que especificamente liga à SEQ ID N°: 1 ou à sua sequência complementar perfeita em uma amostra biológica e contém pelo menos 11 nucleotídeos contíguos como expostos na SEQ ID N°: 1, ou como pode ser o caso, o complemento reverso da sequência na SEQ ID N°: 1, desde que a ligação possa ser detectada, é diagnóstico para a presença de DNA do evento de milho MON89034 naquela amostra. Qualquer sonda que especificamente liga à SEQ ID N°: 2 ou à sua sequência complementar perfeita em uma amostra biológica e contém pelo menos 11 nucleotídeos contíguos como expostos na SEQ ID N°: 2, ou como pode ser o caso, o complemento reverso da sequência na SEQ ID N°: 2, desde que a ligação possa ser detectada, é diagnóstico para a presença de DNA do evento de milho MON89034 naquela amostra.

[0084] Qualquer par de iniciadores que é usado ou projetado para o uso em produzir um amplicon de uma amostra biológica compreen-

dendo DNA de milho, e o amplicon compreende ou SEQ ID N°: 1 ou SEQ ID N°: 2, ou como pode ser o caso, compreende ambas as sequências, é considerado estar dentro do escopo da presente invenção. Qualquer tal amplicon compreendendo ou SEQ ID N°: 1 ou SEQ ID N°: 2, ou ambas, é considerado, para o propósito da invenção descrita aqui, ser diagnóstico para a presença do DNA do evento de milho MON89034 em tal amostra biológica. O exemplo a seguir é fornecido como referência a alguém versado na técnica.

**TABELA 1. PCR Taqman de Ponto Terminal Específico para Evento de Milho MON89034**

Etapa	Reagente	Quantidade	Comentários
1	água livre de nuclease	adicionar para volume final de 10 µl	-
2	2 x Universal Master Mix (Applied Biosystems cat. # 4304437)	5 µl	1,0 µM de concentração final
3	iniciadores SQ2842 (SEQ ID N°: 6), e SQ2843 (SEQ ID N°: 7) ressuspensos em água livre de nuclease a uma concentração de 20 µM cada	0,5 µl	1,0 µM de concentração final
4	iniciador 6FAM® (ressuspensão em água livre de nuclease a uma concentração de 10 µM)	0,2 µl	0,2 µM de concentração final
5	iniciador de controle interno - SQ2842 e iniciador de controle interno SQ2843	0,2 µl	0,2 µM de concentração final
6	DNA extraído (modelo): Amostra a ser analisada Controle negativo  Controle negativo Controle positivo	3,0 µl 4-80 ng de DNA genômico 4ng de DNA genômico de milho não-transgênico sem modelo de DNA (solução em que o DNA foi ressuspensão) 4 ng de DNA genômico de milho heterozigoto do evento MON89034 conhecido	

Etapa	Reagente	Quantidade	Comentários
	• Controle positivo	• 4 ng de DNA genômico de milho heterozigoto do evento MON89034 conhecido	
7	Suavemente misturar, adicionar 1-2 gotas de óleo mineral em cima de cada reação.		

[0085] A amplificação de DNA pode ser montada e conduzida usando quaisquer meios de termociclo, incluindo manipulações manuais ou manipulações eletronicamente controladas das etapas e ciclos de temperatura. Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, ou termociclizador Eppendorf Mastercycler Gradiente ou Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 ou ciclizadores térmicos de MJ Research DNA Engine PTC-225 foram usados de forma bem sucedida para conduzir os parâmetros de ciclismo a seguir. Ao operar a PCR no Eppendorf Mastercycler Gradiente ou MJ Engine, o termociclizador foi submetido a ciclos no modo calculado. Ao usar o Perkin-Elmer 9700, as condições de ciclismo foram conduzidas com a velocidade de elevação ajustada no máximo.

**TABELA 2. Condições do termociclizador do ensaio de zigosidade**

Ciclo Nº	Ajustes: Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
1	50°C 2 minutos
1	95°C 10 minutos
10	95°C 15 segundos
	64°C 1 minuto (-1°C / ciclo)
30	95°C 15 segundos
	54°C 1 minuto
1	10°C intumescimento

## EXEMPLO 2

[0086] Este exemplo ilustra a identificação de uma planta de milho compreendendo o DNA diagnóstico para o evento de milho transgênico MON89034 em seu genoma e a determinação da zigosidade de tal planta de milho.

[0087] Os métodos usados para identificar heterozigoto da progênie homozigoto contendo DNA do evento MON89034 em seu genoma são descritos em um ensaio de zigosidade para os quais as condições são exemplificadas na Tabela 3 e Tabela 4. Os iniciadores de DNA exemplares usados no ensaio de zigosidade são iniciadores SQ2842 (SEQ ID Nº: 6), SQ2843 (SEQ ID Nº: 7), SQ6523 (SEQ ID Nº: 10), SQ6524 (SEQ ID Nº: 11), iniciador marcado 6FAM® PB880 (SEQ ID Nº: 14) e iniciador marcado VIC® PB2931 (SEQ ID Nº: 15). Como indicado acima, 6FAM e VIC são produtos de tintura fluorescente de Applied Biosystems (Foster City, CA) ligado ao iniciador de DNA.

[0088] SQ2842 (SEQ ID Nº: 6), SQ2843 (SEQ ID Nº: 7), SQ6523 (SEQ ID Nº: 10), SQ6524 (SEQ ID Nº: 11), quando usado junto em uma reação de amplificação térmica em que uma amostra biológica contendo o DNA modelo contém DNA que é diagnóstico para a presença do evento de milho MON89034 na amostra, produz um amplicon de DNA diagnóstico para DNA de milho diferente do DNA do evento de milho MON89034 (independente se o DNA de milho é derivado de amostra transgênica ou de alguma outra não-transgênica). Alternativamente, a reação produzirá dois amplicons de DNA diferentes de uma amostra biológica contendo o DNA derivado de um genoma de milho que é heterozigoto para o alelo que corresponde ao DNA inserido presente no evento de milho transgênico MON89034. Estes dois amplicons diferentes corresponderão a um primeiro amplicon que é derivado do locus do genoma de milho do tipo selvagem, e um segundo amplicon que é diagnóstico para a presença de DNA do evento de milho MON89034. Uma amostra do DNA de milho que dá origem apenas a um amplicon simples que corresponde ao segundo amplicon descrito para o genoma heterozigoto é diagnóstico para a presença do evento de milho MON89034 na amostra e é diagnóstico para determinar que o DNA de milho usado como modelo surge de uma semente

de milho que é homozigoto para o alelo que corresponde ao DNA do evento de milho transgênico MON89034 inserido. Os controles para esta análise deveriam incluir um controle positivo de milho homozigoto e heterozigoto contendo o DNA do evento MON89034, um controle negativo de milho não-transgênico ou qualquer outra variedade transgênica de milho, e um controle negativo não contendo nenhum DNA modelo. Este ensaio é otimizado para o uso com um Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, ou termociclizador Eppendorf Mastercycler Gradiente. Outros métodos e aparelho conhecidos àqueles versados na técnica que produzem amplicons que identifica a zigosidade da progênie dos cruzamentos feitos com plantas de MON89034 estão dentro da habilidade da técnica.

**TABELA 3. Soluções de reação do ensaio de zigosidade**

Etapa	Reagente	Quantidade	Comentários
1	água livre de nuclease	adicionar para volume final de 5 µl	-
2	2 x Universal Master Mix (Applied Biosystems cat. # 4304437)	2,5 µl	1 x concentração final
3	iniciadores SEQ ID Nº: 6, e SEQ ID Nº: 7 (ressuspensos em água livre de nuclease a uma concentração de 20 µM)	0,05 µl	0,25 µM de concentração final
4	PB880 SEQ ID Nº: 14 Iniciador 6FAM® (ressuspenso em água livre de nuclease a uma concentração de 10 µM)	0,01 µl	0,4 µM de concentração final
5	PB2931 SEQ ID Nº: 15 Iniciador VIC® (ressuspenso em água livre de nuclease a uma concentração de 10 µM)	0,01 µl	0,15 µM de concentração final
6	<i>REDTaq</i> DNA polimerase (1 unidade/µl)	1,0 µl (recomendado para trocar pipetas antes da próxima etapa)	1 unidade/reação

Etapa	Reagente	Quantidade	Comentários
7	DNA extraído (modelo): Amostras a serem analisadas (folhas individuais) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Controle negativo</li> <li>Controle negativo</li> <li>• Controle positivo</li> <li>• Controle positivo</li> </ul>	2,0 µl 4-80 ng de DNA genômico 4 ng de DNA genômico de milho não-transgênico sem modelo de DNA (solução em que o DNA foi ressuspenso) 4 ng de DNA genômico de milho heterozigoto do evento MON89034 conhecido • 4 ng de DNA genômico de milho heterozigoto do evento MON89034 conhecido	Diluído em água
8	Suavemente misturar, adicionar 1-2 gotas de óleo mineral em cima de cada reação.		

[0089] Amplificação do DNA em um Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, ou termociclizador Eppendorf Mastercycler Gradiente ou Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 ou termociclizador MJ Research DNA Engine PTC-225 foram usados de forma bem sucedida para conduzir os parâmetros de ciclismo a seguir. Ao usar o Eppendorf Mastercycler Gradiente ou MJ Engine, os ciclos foram conduzidos no modo calculado. Ao usar o Perkin-Elmer 9700, os ciclos foram conduzidos com a velocidade de elevação ajustada no máximo.

**TABELA 4. Condições do termociclizador do ensaio de zigosidade<sup>a</sup>**

Nº de Ciclos em Ordem Consecutiva	Temperatura e Duração
1	50°C 2 minutos
1	95°C 10 minutos
10	95°C 15 segundos 64°C 1 minuto (-1°C/ciclo)

Nº de Ciclos em Ordem Consecutiva	Temperatura e Duração
30	95°C 15 segundos 54°C 1 minuto
1	10°C intumescimento

<sup>a</sup>: usando Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700

[0090] Semente que corresponde ao evento transgênico MON89034 foi depositada em 28 de março de 2006 sob o Tratado de Budapeste junto à American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Bulevar, Manassas, Va. 20110. O número de acesso da ATCC ou designação de depósito de patente é PTA-7455. O depósito será mantido no local durante um período de 30 anos, ou 5 anos após a última solicitação, ou durante a vida eficaz da patente, qualquer que seja mais longo, e será substituído conforme necessário durante aquele período.

[0091] Tendo ilustrado e descrito os princípios da presente invenção, deveria ser evidente às pessoas versadas na técnica que a invenção pode ser modificada em arranjo e detalhe sem divergir de tais princípios. Reivindica-se todas as modificações que estejam dentro do espírito e escopo das reivindicações em anexo.

[0092] Todas as publicações e documentos de patente publicados citados neste relatório descritivo estão incorporados aqui por referência na mesma proporção como se cada publicação individual ou pedido de patente específica e individualmente fossem indicados para serem incorporados por referência.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende (i) uma planta de milho transgênica processada ou partes da mesma compreendendo as sequências de nucleotídeo de SEQ ID N°: 1 e SEQ ID N°:2, (ii) uma quantidade detectável da referida molécula de DNA, e (iii) uma quantidade inseticidamente eficaz das proteínas Cry2Ab e Cry1A.105, em que a referida composição é uma mercadoria selecionada do grupo que consiste de fubá, óleo de milho, bolo de milho, semente de milho, gérmen de milho, amido de milho, farinha de milho, pólen de milho, seda de milho, água de maceração de milho, malte de milho, açúcar de milho, xarope de milho, e sólidos de produtos perecíveis de destiladores (DDGS).

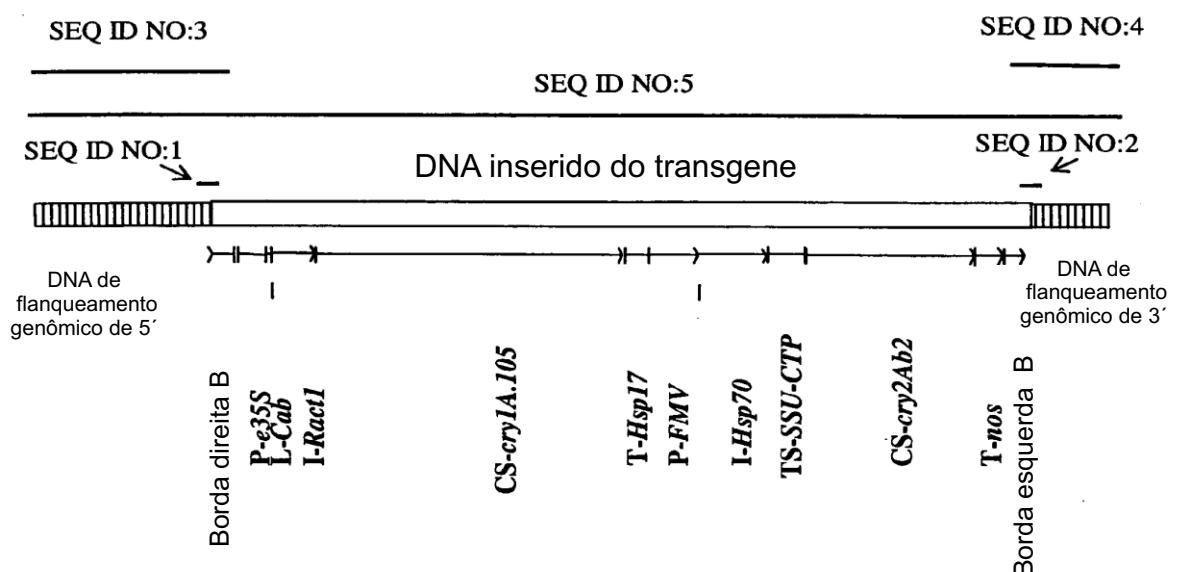


FIG. 1