



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112012006079-1 B1



(22) Data do Depósito: 26/08/2010

(45) Data de Concessão: 26/04/2022

(54) Título: MOLÉCULA DE DNA RECOMBINANTE, MÉTODOS E KIT PARA SUA DETECÇÃO

(51) Int.Cl.: A01H 5/00; A23D 9/00; C12N 15/11; C12Q 1/6895.

(30) Prioridade Unionista: 17/09/2009 US 61/243,227.

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

(72) Inventor(es): RONALD J. BRINKER; WEN C. BURNS; PAUL C. C. FENG; ANJU GUPTA; SIO-WAI HOI; MARIANNE MALVEN; KUNSHENG WU.

(86) Pedido PCT: PCT US2010046759 de 26/08/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/034704 de 24/03/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 16/03/2012

(57) Resumo: MOLÉCULAS DE DNA RECOMBINANTES, MÉTODOS E KIT PARA SUA DETECÇÃO, MICROORGANISMO E PRODUTO COMPREENDENDO TAIS MOLÉCULAS, MÉTODOS PARA CONTROLE DE ERVAS DANINHAS, PARA PRODUÇÃO DE SEMENTE DE SOJA E DE UMA PLANTA DE SOJA, BEM COMO DE DETERMINAÇÃO DA ZIGOSIDADE DE UMA PLANTA OU SEMENTE. A presente invenção refere-se a uma planta do evento de soja transgênico MON 87708 e plantas, células vegetais, sementes, partes vegetais e produtos derivados do evento MON 87708. A invenção também refere-se a polinucleotídeos específicos para o evento MON 87708 e plantas, células vegetais, sementes, partes vegetais e produtos compreendendo polinucleotídeos específicos para o evento MON 87708. A invenção também fornece métodos relacionados ao evento MON 87708.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MOLÉCULAS DE DNA RECOMBINANTE, MÉTODOS E KIT PARA SUA DETECÇÃO"**.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido de patente reivindica o benefício de Pedido Provisório de Patente U.S No. 61/243.227 depositado em 17 de setembro de 2009, que é neste pedido incorporado por referência em sua totalidade.

INCORPORAÇÃO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[002] A listagem de sequências que está contida no arquivo denominado "55544-0001_seqlisting.txt", que tem 19,5 kilobytes (tamanho medido no Microsoft Windows®) e foi criada em 13 de agosto de 2010, é depositada por meio deste por submissão eletrônica e é incorporada por referência neste pedido.

CAMPO DA INVENÇÃO

[003] A invenção refere-se ao evento transgênico de *Glycine max* MON 87708. O evento exibe tolerância ao herbicida dicamba. A invenção também se refere a plantas, partes vegetais, sementes vegetais, células vegetais, produtos agrícolas e métodos relacionados ao evento MON 87708 e fornece moléculas de nucleotídeo que são únicas para o evento e foram criadas decorrentes da inserção de DNA transgênico no genoma de uma planta de *Glycine max*.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] Soja (*Glycine max*) é uma cultura importante em muitas áreas do mundo e métodos da biotecnologia foram aplicados a esta cultura a fim de produzir soja com traços desejáveis. Tal traço desejável é tolerância a herbicidas. A expressão de um transgene de tolerância a herbicidas em uma planta pode conferir o traço desejável de tolerância a herbicidas na planta, mas a expressão do transgene pode ser influenciada pela posição cromossômica e o resultado genômico da

inserção do transgene. Por exemplo, foi observado em plantas que muitas vezes há variação no nível e padrão de expressão transgênica entre eventos individuais que se diferenciam no sítio de inserção cromossômica do transgene, mas são idênticos. Também pode haver diferenças fenotípicas ou agronômicas indesejáveis e/ou desejáveis entre os eventos. Por causa disto, é muitas vezes necessário produzir e analisar um grande número de eventos individuais de transformação vegetal a fim de selecionar um evento que possua tanto o traço desejável como características fenotípicas e agrícolas ótimas necessárias para torná-lo adequado para fins comerciais. Tal seleção muitas vezes requer testes em estufa e campo com muitos eventos ao longo de múltiplos anos, em múltiplas posições e sob uma variedade de condições para que uma quantidade significativa de dados agronômicos, fenotípicos e moleculares possa ser coletada. Os dados e a observação resultantes então devem ser analisados por equipes de cientistas e agrônomos com o objetivo de selecionar um evento comercialmente adequado. Tal evento, uma vez selecionado, pode então ser usado para introgressão do traço desejável em outros contextos genéticos usando métodos de melhoramento vegetal, e dessa forma, produção de diversas variedades de culturas diferentes que contenham o traço desejável e sejam apropriadamente adaptadas a condições de crescimento local específicas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[005] A invenção fornece plantas de soja transgênicas designadas evento MON 87708, que exibem tolerância comercialmente aceitável a aplicações do herbicida dicamba, tendo a semente representativa depositada no American Type Culture Collection (ATCC) com o No. de Acesso PTA-9670. A invenção também fornece novas moléculas de DNA relacionadas ao evento de soja MON 87708 e métodos de uso destas moléculas. A invenção também fornece sementes, progê-

nie, partes vegetais, células e produtos base do evento de soja MON 87708. A invenção também fornece métodos de uso do evento de soja MON 87708 e métodos de produção da soja tolerante à dicamba.

[006] A invenção fornece moléculas de DNA recombinantes relacionadas ao evento de soja MON 87708. Estas moléculas de DNA recombinante podem compreender moléculas de nucleotídeo que têm uma sequência nucleotídica que representa uma região do DNA genômico que flanqueia a inserção do transgene, e/ou uma região de inserção do transgene e/ou uma sequência contígua de qualquer uma destas regiões, tais como uma região de ligação entre a inserção do transgene e DNA genômico que flanqueia evento de soja MON 87708. A invenção também fornece moléculas de DNA úteis como iniciadores e sondas diagnósticas para o evento de soja MON 87708 e amplicons diagnósticos para a presença do evento de soja MON 87708. Plantas de soja, células vegetais, partes vegetais, produtos de base, progênie e sementes compreendendo estas moléculas também são descritos.

[007] A invenção fornece métodos, composições, e conjuntos úteis para detectar a presença e/ou ausência de DNA derivado do evento de soja MON 87708 e dessa forma a presença e/ou ausência do evento. A invenção fornece um método para detecção de MON 87708 pelo contato de uma amostra compreendendo DNA com um conjunto de iniciadores que quando usado em uma reação de amplificação de ácidos nucleicos com DNA genômico do evento de soja MON 87708 produz DNA amplificado diagnóstico para o evento de soja MON 87708, realizando uma reação de amplificação de ácidos nucleicos que por meio disso produz DNA amplificado, e detecta a presença e/ou ausência de DNA amplificado. A invenção também fornece um método para detecção de MON 87708 pelo contato de uma amostra compreendendo DNA com uma sonda que quando usada em uma reação de hibridização com DNA do evento de soja MON 87708 hibri-

diza a uma molécula de DNA específica para o evento de soja MON 87708, realizando uma reação de hibridização, e detectando a hibridização da sonda à molécula de DNA. Os kits compreendendo os métodos e composições da invenção úteis para detectar a presença de DNA derivado do evento de soja MON 87708 também são fornecidos.

[008] A invenção fornece uma planta de soja, semente, célula vegetal, progênie vegetal, parte vegetal ou produto de base derivados de uma planta, célula vegetal ou semente do evento de soja MON 87708. A invenção também fornece uma planta de soja, semente, célula vegetal, progênie vegetal, parte vegetal ou produto de base compreendendo uma molécula de DNA recombinante tendo uma sequência nucleotídica selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID NO: 1-8, e complementos e fragmentos das mesmas. A invenção também fornece uma planta de soja, semente, célula vegetal, progênie vegetal, parte vegetal ou produto de base derivados da planta ou semente do evento de soja MON 87708 e compreendendo uma molécula de DNA recombinante que produz uma molécula de DNA amplificada compreendendo a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 e/ou SEQ ID NO: 8 em um método de amplificação de DNA.

[009] A invenção fornece um método para controle de ervas daninhas em um campo pelo plantio do evento de soja MON 87708 e então aplicação de uma dose eficaz do herbicida dicamba capaz de controlar as ervas daninhas sem prejudicar as plantas do evento de soja MON 87708. A invenção também fornece um método para controle de ervas daninhas em um campo pela aplicação de uma dose eficaz do herbicida dicamba para controle de ervas daninhas em um campo e então plantio do evento de soja MON 87708 no campo. A invenção também fornece um método para produção da semente de soja essencialmente sem as sementes de espécies de ervas daninhas tóxicas pelo plantio das sementes da variedade de soja MON 87708 tolerante

à dicamba em um campo, pela aplicação uma dose eficaz pós-emergência do herbicida dicamba suficiente para matar as espécies de ervas daninhas tóxicas ao campo, e colheita de semente do campo.

[0010] A invenção fornece métodos de produção de uma planta e/ou semente de soja que tolera a aplicação do herbicida dicamba pelo cruzamento sexuado de uma planta de evento de soja MON 87708 compreendendo a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 e/ou SEQ ID NO: 8 com uma segunda planta de soja, por meio disso produzindo semente, cultivando a semente para produzir progênies vegetais, tratando as progênies vegetais com dicamba, e selecionando uma progênie vegetal que seja tolerante à dicamba. Os métodos também podem incluir autofecundação da progênie vegetal selecionada para produzir uma pluralidade de progênies vegetais de segunda geração e seleção a partir destes de uma planta tolerante à dicamba. Os métodos também podem incluir cruzamento sexuado da progênie vegetal selecionada com outra planta de soja para produzir a semente, crescimento da semente para produzir uma segunda geração de progênies vegetais, tratamento da segunda geração de progênies vegetais com dicamba, e seleção de uma progênie vegetal de segunda geração que seja tolerante à dicamba. A invenção fornece métodos de produção de uma planta e/ou semente de soja que tolera a aplicação do herbicida dicamba por autofecundação de uma planta do evento de soja tolerante MON 87708 à dicamba compreendendo SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 e/ou SEQ ID NO: 8, por meio disso produzindo semente, cultivando a semente para produzir progênies vegetais, tratando as progênies vegetais com dicamba; e selecionando uma progênie vegetal que seja tolerante à dicamba.

[0011] A invenção fornece métodos de determinação da zigosidade de uma planta ou semente de evento de soja MON 87708 compreendendo o contato de uma amostra de DNA de soja com um conjunto

de iniciadores compreendendo a SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, e SEQ ID NO: 14 e um conjunto de sondas compreendendo as SEQ ID NO: 15 e SEQ ID NO: 16; então realizando uma reação de amplificação de ácidos nucleicos com a amostra, o conjunto de iniciadores, e sondas estabelecidos; então detectando em seguida na reação de amplificação de ácido nucleico um primeiro sinal fluorescente que é diagnóstico para o evento MON 87708 e um segundo sinal fluorescente diferente do primeiro sinal fluorescente e que é diagnóstico para DNA genômico de soja nativa correspondente à posição da inserção do transgene evento MON 87708; e análise da presença e/ou ausência do primeiro sinal fluorescente e do segundo sinal fluorescente na reação de amplificação de ácidos nucleicos, em que a presença de ambos os sinais fluorescentes indica que a amostra é heterozigota para o evento MON 87708 já que a presença somente do primeiro sinal fluorescente indica que a amostra é homozigota para o evento MON 87708.

[0012] A invenção também fornece uma planta de soja, semente, célula vegetal ou parte vegetal compreendendo a região de haplótipo de soja no grupo de ligação 9 aproximadamente na posição de mapa 143,5 compreendendo um gene de tolerância à dicamba e ainda definido pela janela 19743 e 19767 de haplótipo, e métodos de uso da mesmo. Os aspectos precedentes e outros da invenção ficarão mais evidentes a partir da seguinte descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0013] A figura 1 ilustra a organização do inserto transgênico no genoma do evento de soja MON 87708; [A] corresponde à posição relativa da SEQ ID NO: 1, que está a sessenta nucleotídeos da ligação entre o DNA genômico de soja e a porção 5' do inserto de DNA do transgene; [A'] corresponde à posição relativa da SEQ ID NO: 7, que está a cem nucleotídeos da ligação entre o DNA genômico de soja e a

porção 5' do inserto de DNA do transgene; [B] corresponde à posição relativa da SEQ ID NO: 2, que está a sessenta nucleotídeos da ligação entre o DNA genômico de soja e a porção 3' do inserto de DNA do transgene; [B'] corresponde à posição relativa da SEQ ID NO: 8, que está a cem nucleotídeos da ligação entre o DNA genômico de soja e a porção 3' do inserto de DNA do transgene; [C] corresponde à posição relativa da SEQ ID NO: 3, que é a sequência de genoma de soja que flanqueia a extremidade 5' arbitrariamente destinada/designada do cassete de expressão integrado no genoma no evento MON 87708; [D] corresponde à posição relativa da SEQ ID NO: 4, que é a sequência de genoma de soja que flanqueia extremidade 3' do cassete de expressão arbitrariamente determinada/designada integrado no genoma do evento MON 87708; [E] representa vários elementos compreendendo a SEQ ID NO: 5 e é a sequência do cassete de expressão inserido no genoma do evento MON 87708; e [F] representa a sequência contígua (fornecida como a SEQ ID NO: 6) compreendendo, como representado na figura da esquerda para a direita, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 4, em que SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, e SEQ ID NO: 8 estão incluídas, uma vez que estas sequências estão presentes no genoma no evento MON 87708.

BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

[0014] A SEQ ID NO: 1 é uma sequência de sessenta nucleotídeos que representa a ligação 5' entre o DNA genômico de soja e o cassete de expressão transgênico integrado. A SEQ ID NO: 1 está posicionada na SEQ ID NO: 6 na posição de nucleotídeo 1097-1156.

[0015] A SEQ ID NO: 2 é uma sequência de sessenta nucleotídeos que representa a ligação 3' entre o DNA genômico de soja e o cassete de expressão transgênico integrado. A SEQ ID NO: 2 está posicionada na SEQ ID NO: 6 na posição de nucleotídeo 4100-4159.

[0016] A SEQ ID NO: 3 é a sequência que flanqueia 5' o DNA in-

serido do evento de soja MON 87708 até e incluindo uma região de inserção de DNA do transgene.

[0017] A SEQ ID NO: 4 é a sequência que flanqueia 3' o DNA inserido do evento de soja MON 87708 até e incluindo uma região de inserção de DNA do transgene.

[0018] A SEQ ID NO: 5 é a sequência do cassete de expressão transgênico integrado.

[0019] A SEQ ID NO: 6 é a sequência nucleotídica que representa o contig da sequência que flanqueia 5' o DNA inserido do evento de soja MON 87708 (SEQ ID NO: 3), a sequência do DNA inserido (SEQ ID NO: 5), e a sequência que flanqueia 3' o DNA inserido do evento de soja MON 87708 (SEQ ID NO: 4) e inclui a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8.

[0020] A SEQ ID NO: 7 é uma sequência de cem nucleotídeos que representa a ligação 5' entre o DNA genômico de soja e o cassete de expressão transgênico integrado.

[0021] A SEQ ID NO: 8 é uma sequência de cem nucleotídeos que representa a ligação 3' entre o DNA genômico de soja e o cassete de expressão transgênico integrado.

[0022] A SEQ ID NO: 9 é a sequência de um iniciador referido como o Iniciador SQ13570 e usado para identificar o evento de soja MON 87708. É complementar ao cassete de expressão inserido na região próxima à borda 3' de inserção do transgene. Um amplicon de PCR produzido a partir de um ensaio TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) usando a combinação de iniciadores SQ13570 e SQ13571 (SEQ ID NO: 10) é um resultado positivo para a presença do evento MON 87708.

[0023] A SEQ ID NO: 10 é a sequência de um iniciador referido como o Iniciador SQ13571 e usado para identificar o evento de soja MON 87708. É complementar a uma região que flanqueia 3' cassete

de expressão inserido e próximo da borda de inserção de DNA do transgene. Um amplicon de PCR produzido a partir de um ensaio TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) usando a combinação de iniciadores SQ13570 (SEQ ID NO: 9) e SQ13571 é um resultado positivo para a presença do evento MON 87708.

[0024] A SEQ ID NO: 11 é a sequência de uma sonda referida como a Sonda PB4655 e usada para identificar o evento de soja MON 87708. É complementar a uma região ao longo da junção 3' do cassette de expressão inserido e DNA genômico. Esta sonda é um oligonucleotídeo sintético marcado com 6-FAM®. A liberação de um sinal fluorescente em uma reação de amplificação usando os iniciadores SQ13570 e SQ13571 (SEQ ID NO: 9-10) em combinação com a sonda marcada com 6-FAM® PB4655 é diagnóstica do evento MON 87708 em um ensaio TAQMAN®.

[0025] A SEQ ID NO: 12 é a sequência de um iniciador referido como o Iniciador SQ20632 e usado para identificar a zigosidade de evento MON 87708.

[0026] A SEQ ID NO: 13 é a sequência de um iniciador referido como o Iniciador SQ20636 e usado para identificar a zigosidade da soja selvagem e do evento MON 87708.

[0027] A SEQ ID NO: 14 é a sequência de um iniciador referido como o Iniciador SQ20637 e usado para identificar a zigosidade da soja selvagem.

[0028] A SEQ ID NO: 15 é a sequência de uma sonda referida como a Sonda PB10130 e usada para um ensaio de zigosidade de evento MON 87708.

[0029] A SEQ ID NO: 16 é a sequência de uma sonda referida como a Sonda PB10131 e usada para um ensaio de zigosidade de soja selvagem.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0030] As seguintes definições e métodos são fornecidos para definir melhor a invenção e guiar aqueles versados na técnica na prática da invenção. A menos que de outra maneira observado, os termos devem ser entendidos de acordo com o uso convencional por aqueles versados na técnica relevante.

[0031] A invenção fornece um evento de soja transgênica MON 87708 que exhibe tolerância comercialmente aceitável a aplicações do herbicida dicamba. O evento compreende uma inserção única de DNA transgênico no cromossomo/genoma do germoplasma de soja. Um "evento" é produzido por: (i) transformação de uma célula vegetal com um construto de ácido nucleico que inclui um transgene de interesse, (ii) regeneração de uma população de plantas que resultam da inserção do transgene no genoma da planta, e (iii) seleção de uma planta particular caracterizada pela inserção do transgene em uma posição particular no genoma da planta. O termo "evento" refere-se ao transformante original que inclui o transgene inserido na posição particular no genoma da planta. O termo "evento" também se refere à progênie do transformante que inclui o transgene inserido na posição particular no genoma da planta. Tal progênie pode ser produzida por um cruzamento exogâmico sexuado entre o transformante, ou sua progênie, e outra planta. Tal outra planta pode ser uma planta transgênica que compreende o mesmo transgene ou diferente e/ou uma planta não transgênica, tal como uma de uma variedade diferente. Mesmo depois que retrocruzamento repetido para um parental recorrente, DNA inserido e DNA flanqueador do parental transformado está presente na progênie do cruzamento na mesma posição genômica.

[0032] Como usado neste pedido, o termo "soja" significa *Glycine max* e inclui todas as variedades vegetais que podem ser produzidas com a soja, incluindo espécies de soja selvagens bem como aquelas plantas que pertencem à Glicina o que permite reproduzir-se entre espécies.

[0033] O termo "evento" também se refere a uma molécula de DNA do transformante original compreendendo DNA inserido e a DNA de soja flaqueador genômico imediatamente adjacente a qualquer lado do DNA inserido. Esta molécula de DNA é criada pelo ato de inserção do DNA transgênico no genoma da planta de soja, isto é, pelo ato da transformação. Esta molécula de DNA, por isso, compreende uma sequência nucleotídica que é tanto específica para o evento como é única para o genoma da planta de soja na qual DNA transgênico foi inserido, em que esta sequência nucleotídica contém tanto a sequência de uma região particular do DNA genômico da soja como do inserto de DNA transgênico. O arranjo de DNA inserido no evento de soja MON 87708 em relação ao DNA do genoma da planta de soja circundante é, por isso, específico e único para o evento de soja MON 87708. Esta molécula de DNA é também uma parte integrante do cromossomo de soja do evento MON 87708 e como tal é estático na planta e pode ser transmitido à progênie da planta.

[0034] O evento MON 87708 compreende um transgene que confere a tolerância a aplicações do herbicida dicamba à planta de soja. "Dicamba" refere-se ao ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico. Dicamba é um herbicida de auxina sintética útil para controle de ervas daninhas latifoliadas. As plantas de soja foram transformadas com dicamba mono-oxigenase (DMO), uma enzima clonada de *Stenotrophomonas maltophilia* que é comumente encontrado na rizosfera do solo. Dicamba mono-oxigenase é uma enzima que catalisa a desativação de dicamba através de uma reação de O-demetilação ao composto não herbicida ácido 3,5-diclorossalicílico. Em algumas áreas das espécies de ervas daninhas tóxicas mundiais, as sementes podem contaminar sementes de soja coletadas que podem afetar a saúde e nutrição de animais alimentados com os produtos de soja contaminados. Estas plantas podem ser eliminadas de um campo de soja pelo tratamento com um

herbicida dicamba. Os membros deste grupo de ervas daninhas tóxicas incluem *Cardaria spp.*, *Heliotropium spp.*, *Centaurea spp.*, *Senecio spp.*, *Crotalaria spp.*, *Solanum spp.*, *Xanthium spp.*, *Amsinckia spp.*, *Cassia spp.*, *Sesbania spp.*, *Datura spp.*, *Ricinus spp.*, *Argemone spp.*, *Corchorus spp.*, *Impomoea spp.*, e *Echium spp.*

[0035] Como usado neste pedido, o termo "recombinante" refere-se a uma forma de DNA e/ou proteína e/ou um organismo que não seria normalmente encontrado na natureza e como tal foi criado por intervenção humana. Tal intervenção humana pode produzir uma molécula de DNA recombinante e/ou uma planta recombinante. Como usado neste pedido, uma "molécula de DNA recombinante" é uma molécula de DNA que compreende uma combinação de moléculas de DNA que não ocorreriam naturalmente em conjunto e são o resultado da intervenção humana, por exemplo, uma molécula de DNA que é compreendida por uma combinação de pelo menos duas moléculas de DNA heterólogas entre si, e/ou uma molécula de DNA que é artificialmente sintetizada e compreende uma sequência polinucleotídica que se desvia da sequência de polinucleotídica que existiria normalmente na natureza, e/ou uma molécula de DNA que compreende um transgene artificialmente incorporado no DNA genômico de uma célula hospedeira e DNA associado flanqueador do genoma da célula hospedeira. Um exemplo de uma molécula de DNA recombinante é uma molécula de DNA descrita neste pedido resultando da inserção do transgene no DNA genômico da soja, que pode resultar enfim na expressão de RNA recombinante e/ou molécula proteica naquele organismo. Como usado neste pedido, uma "planta recombinante" é uma planta que não existiria normalmente na natureza, é o resultado da intervenção humana, e contém um transgene e/ou molécula de DNA heteróloga incorporada em seu genoma. Em consequência de tal alteração genômica, a planta recombinante é distintamente diferente da planta

selvagem relacionada. Um exemplo de uma planta recombinante é uma planta de soja descrita neste pedido como Evento MON 87708.

[0036] Como usado neste pedido, o termo "transgene" refere-se a uma molécula de nucleotídeo artificialmente incorporada no genoma de uma célula hospedeira. Tal transgene pode ser heterólogo à célula hospedeira. O termo "planta transgênica" refere-se a uma planta compreendendo tal transgene.

[0037] Como usado neste pedido, o termo "heterólogo" refere-se a uma primeira molécula não normalmente encontrada em combinação com uma segunda molécula na natureza. Por exemplo, uma molécula pode ser derivada de uma primeira espécie e inserida no genoma de uma segunda espécie. A molécula seria dessa forma heteróloga ao hospedeiro e artificialmente incorporada no genoma de uma célula hospedeira.

[0038] Como usado neste pedido, o termo "quimérico" refere-se a uma molécula de DNA única produzida pela fusão de uma primeira molécula de DNA a uma segunda molécula de DNA, onde nem a primeira nem a segunda molécula de DNA seria normalmente encontrada naquela configuração, isto é, fundida à outra. A molécula de DNA quimérica é dessa forma uma nova molécula de DNA de outra maneira normalmente não encontrada na natureza.

[0039] A invenção fornece moléculas de DNA e suas sequências nucleotídicas correspondentes. Como usado neste pedido, o termo "DNA", "molécula de DNA", "molécula de nucleotídeo" refere-se a uma molécula de DNA de origem genômica ou sintética, isto é, um polímero de bases de desoxirribonucleotídeos ou uma molécula de polinucleotídeo, lida a partir da extremidade 5' (a montante) à extremidade 3' (a jusante). Como usado neste pedido, o termo "sequência de DNA", "sequência nucleotídica" ou "sequência polinucleotídica" refere-se à sequência nucleotídica de uma molécula de DNA. A nomenclatura usada

neste pedido é aquela necessária pelo Título 37 do Código dos Estados Unidos de Regulações federais § 1.822 e apresentada nas tabelas no Padrão WIPO ST.25 (1998), Apêndice 2, Tabelas 1 e 3. Pela convenção, as sequências nucleotídicas da invenção fornecidas como a SEQ ID NO: 1-8 e fragmentos das mesmas são descritas com referência somente a uma fita das duas fitas da sequência nucleotídica complementar. Por consequência, as sequências complementares (*isto é*, sequências da fita complementar), também referidas na técnica como sequências complementares reversas, estão dentro do escopo da invenção e são expressamente destinadas a estar dentro do escopo da invenção reivindicada.

[0040] A sequência nucleotídica correspondente à sequência nucleotídica completa de DNA transgênico inserido e segmentos substanciais do DNA do genoma de soja que flanqueia qualquer extremidade de DNA transgênico inserido é fornecida neste pedido como a SEQ ID NO: 6. Uma subseção desta é DNA transgênico inserido fornecido como a SEQ ID NO: 5. A sequência nucleotídica de DNA de genoma de soja fisicamente ligado pela ligação de ligação fosfodiéster e por isso flanqueando a extremidade 5' de DNA transgênico inserido é apresentada como mostrada na SEQ ID NO: 3. A sequência nucleotídica de DNA de genoma de soja fisicamente ligado pela ligação de ligação fosfodiéster e por isso flanqueando a extremidade 3' de DNA transgênico inserido é apresentada como mostrada na SEQ ID NO: 4.

[0041] O evento de soja MON 87708 compreende ainda duas regiões, uma transpondo a posição 5' e uma transpondo a posição 3' onde o DNA transgênico é inserido no DNA genômico, referido neste pedido como junção 5' e 3', respectivamente. Uma "sequência de ligação" ou "região de ligação" refere-se à sequência de DNA e/ou molécula de DNA correspondente que transpõe o DNA transgênico inserido e o DNA genômico adjacente flanqueador. As sequências de ligação

podem ser arbitrariamente representadas por duas sequências de 60 nucleotídeos fornecidas como a SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, cada uma representando 30 nucleotídeos de DNA genômico flanking adjacente e contíguas com 30 nucleotídeos do DNA do inserto. Alternativamente, as sequências de ligação podem ser arbitrariamente representadas por duas sequências de 100 nucleotídeos fornecidas como a SEQ ID NO: 7 e SEQ ID NO: 8, cada uma representando 50 nucleotídeos do DNA genômico flanking adjacente e contíguas com 50 nucleotídeos do DNA do inserto. Estes nucleotídeos são unidos por ligação fosfodiéster e no evento de soja MON 87708 estão presentes como parte do genoma. Na soja, a identificação de uma ou mais das SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, e SEQ ID NO: 8 em uma amostra derivada de uma planta de soja, semente, ou parte vegetal é determinante que DNA foi obtido do evento de soja MON 87708 e é diagnóstico para a presença em uma amostra de DNA do evento de soja MON 87708. A invenção, dessa forma, fornece uma molécula de DNA que contém pelo menos a sequência nucleotídica como apresentada na SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 e/ou SEQ ID NO: 8. Qualquer segmento de DNA derivado do evento de soja transgênico MON 87708 que é suficiente para incluir a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 e/ou SEQ ID NO: 8 está dentro do escopo da invenção. Além disso, qualquer polinucleotídeo compreendendo uma sequência complementar a qualquer uma das sequências descritas dentro deste parágrafo está dentro do escopo da invenção. A figura 1 ilustra o arranjo físico da SEQ ID NO: 1-5 e 7-8 em relação à SEQ ID NO: 6 arranjada de 5' a 3'.

[0042] A invenção fornece moléculas de DNA exemplares que podem ser usadas como iniciadores ou sondas para diagnosticar a presença de DNA derivado do evento de planta de soja MON 87708 em uma amostra. Tais iniciadores ou sondas são específicos para uma

sequência alvo de ácidos nucleicos e como tais são úteis para a identificação da sequência de ácidos nucleicos do evento de soja MON 87708 pelos métodos da invenção descrita neste pedido.

[0043] Um "iniciador" é tipicamente um polinucleotídeo altamente purificado, isolado que é projetado para o uso em métodos de anelamento específico ou de hibridização que envolvem amplificação térmica. Um par de iniciadores pode ser usado com DNA molde, tal como uma amostra de DNA genômico de soja, em uma amplificação térmica, tal como reação de polimerase em cadeia (PCR), para produzir um amplicon, onde o amplicon produzido de tal reação teria uma sequência de DNA correspondente à sequência de DNA molde localizado entre os dois sítios onde os iniciadores se hibridizaram ao molde. Como usado neste pedido, um "amplicon" é uma parte ou fragmento de DNA que foi sintetizado usando técnicas de amplificação. Um amplicon da invenção compreende pelo menos a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 e/ou SEQ ID NO: 8. Um iniciador é tipicamente projetado para hibridizar a uma fita de DNA alvo complementar para formar um híbrido entre o iniciador e a fita de DNA alvo, e a presença do iniciador é um ponto do reconhecimento por uma polimerase para começar a extensão do iniciador (*isto é*, a polimerização de nucleotídeos adicionais em uma molécula de alongamento de nucleotídeos) usando como um molde a fita de DNA alvo. Os pares de iniciadores, como usados na invenção, são destinados a referir-se ao uso de dois iniciadores que se ligam a fitas opostas de um segmento de nucleotídeo de fita dupla com o objetivo de amplificar linearmente o segmento de polinucleotídeo entre as posições visadas para ligação pelos membros individuais do par de iniciadores, tipicamente em uma reação de amplificação térmica ou outros métodos convencionais de amplificação de ácidos nucleicos. Moléculas de DNA exemplares úteis como iniciadores são fornecidas como a SEQ ID NO: 9-10. O par de iniciadores for-

necido como a SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO: 10 é útil como uma primeira molécula de DNA e uma segunda molécula de DNA que é diferente da primeira molécula de DNA, e ambas são cada uma de comprimento suficiente de nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, ou da SEQ ID NO: 6 para funcionar como iniciadores de DNA que, quando usados em conjunto em uma reação de amplificação térmica com DNA molde derivado do evento de soja MON 87708, produzem um amplicon compreendendo a SEQ ID NO: 2.

[0044] Uma "sonda" é um ácido nucleico isolado que é complementar a uma fita de um ácido nucleico alvo. As sondas de acordo com a invenção incluem não somente ácidos desoxirribonucleicos ou ribonucleicos, mas também poliamida e outros materiais de sonda que se ligam especificamente a uma sequência de DNA alvo e a detecção de tal ligação pode ser útil em diagnosticar, discriminar, determinar ou confirmar a presença daquela sequência de DNA alvo em uma amostra particular. Uma sonda pode ser ligada a uma marcação detectável convencional ou molécula repórter, *por exemplo*, um isótopo radioativo, ligante, agente quimioluminescente, ou enzima. Uma molécula de DNA exemplar útil como uma sonda é fornecida como a SEQ ID NO: 11.

[0045] Sondas e iniciadores de acordo com a invenção podem ter identidade de sequência completa com a sequência alvo, embora os iniciadores e as sondas que se diferenciam da sequência alvo que conservam a capacidade de hibridizar preferencialmente para sequências alvo possam ser projetados por métodos convencionais. Para uma molécula de ácidos nucleicos servir como um iniciador ou sonda precisa somente ser suficientemente complementar à sequência para ser capaz de formar uma estrutura de fita dupla estável sob solvente particular e concentrações de sal empregadas. Qualquer hibridização de ácidos nucleicos convencional ou método de amplificação podem ser usados para identificar a presença de DNA transgênico do evento

de soja MON 87708 em uma amostra. As sondas e iniciadores têm geralmente pelo menos aproximadamente 11 nucleotídeos, pelo menos aproximadamente 18 nucleotídeos, pelo menos aproximadamente 24 nucleotídeos, ou pelo menos aproximadamente 30 nucleotídeos ou mais de comprimento. Tais sondas e iniciadores hibridizam especificamente a uma sequência de DNA alvo sob condições de hibridização estritas. Condições de estritância convencionais são descritas por Sambrook *et al.*, 1989, e por Haymes *et al.*, em: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC (1985). Como usado neste pedido, duas moléculas de ácidos nucleicos são capazes de hibridizar especificamente entre si se as duas moléculas forem capazes de formar uma estrutura de ácidos nucleicos de fita dupla antiparalela. Uma molécula de ácidos nucleicos é o "complemento" de outra molécula de ácidos nucleicos se exibirem complementaridade completa. Como usado neste pedido, as moléculas exibem "complementaridade completa" quando cada nucleotídeo de uma das moléculas é complementar a um nucleotídeo da outra. Duas moléculas são "minimamente complementares" se puderem hibridizar entre si com a estabilidade suficiente para permitir-lhes que permaneçam aneladas entre si pelo menos sob condições convencionais de "baixa estritância". Similarmente, as moléculas são "complementares" se puderem hibridizar entre si com estabilidade suficiente para permitir-lhes que permaneçam aneladas entre si sob condições convencionais de "alta estritância". Afastamentos da complementaridade completa são, por isso, permissíveis, enquanto tais afastamentos não impedirem completamente a capacidade das moléculas de formarem uma estrutura de fita dupla.

[0046] Como usado neste pedido, o termo "isolado" refere-se a pelo menos separação parcial de uma molécula de outras moléculas normalmente associadas a ela em seu estado nativo ou natural. Em

uma modalidade, o termo "isolado" refere-se a uma molécula de DNA que pelo menos é separada parcialmente dos ácidos nucleicos que normalmente flanqueiam a molécula de DNA no seu estado nativo ou natural. Dessa forma, as moléculas de DNA fundidas a sequências reguladoras ou de codificação com as quais não estão associadas normalmente, por exemplo, como resultado de técnicas recombinantes, são consideradas isoladas neste pedido. Tais moléculas são consideradas isoladas mesmo quando integradas no cromossomo de uma célula hospedeira ou presente em uma solução de ácidos nucleicos com outras moléculas de DNA.

[0047] Qualquer número de métodos bem conhecidos pelos versados na técnica pode ser usado para isolar e manipular uma molécula de DNA, ou fragmento da mesma, descrita na invenção. Por exemplo, tecnologia de PCR (reação de polimerase em cadeia) pode ser usada para amplificar uma molécula particular de DNA inicial e/ou produzir variantes da molécula original. As moléculas de DNA, ou fragmento das mesmas, também podem ser obtidas por outras técnicas tais como síntese direta do fragmento por meios químicos, como é comumente praticado usando um sintetizador de oligonucleotídeos automatizado.

[0048] As moléculas de DNA e sequências nucleotídicas correspondentes fornecidas neste pedido são, por isso, úteis para, entre outras coisas, identificar o evento de soja MON 87708, selecionar variedades vegetais ou híbridos compreendendo evento de soja MON 87708, detectar a presença de DNA derivado do evento de soja transgênica MON 87708 em uma amostra, e monitorar amostras da presença e/ou ausência do evento de soja MON 87708 ou partes vegetais derivadas do evento de soja MON 87708.

[0049] A invenção fornece plantas de soja, progênie, sementes, células vegetais, partes vegetais (tais como pólen, óvulo, vagem, tecido de

flor, tecido de raiz, tecido de tronco, e tecido de folha), e produtos. Estas plantas, progênie, sementes, células vegetais, partes vegetais e produtos contêm uma quantidade detectável de um polinucleotídeo da invenção, *isto é*, tal como um polinucleotídeo tendo pelo menos uma das sequências fornecidas como a SEQ ID NO: 1-8. Plantas, progênie, sementes, células vegetais e partes vegetais da invenção também podem conter um ou mais transgenes adicionais. Tal transgene pode ser qualquer sequência nucleotídica que codifica uma proteína ou a molécula de RNA conferindo um traço desejável incluindo, mas não limitada à, resistência a insetos aumentada, eficiência aumentada de uso de água, desempenho de rendimento aumentado, resistência aumentada à seca, qualidade de semente aumentada, qualidade nutritiva melhorada e/ou tolerância aumentada a herbicidas, no qual o traço desejável é medido com respeito a uma planta de soja sem o tal transgene adicional.

[0050] A invenção fornece plantas de soja, progênie, sementes, células vegetais, e parte vegetal, tais como pólen, óvulo, vagem, flor, raiz ou tecido de tronco, e folhas derivadas de um evento de planta de soja transgênica MON 87708. Uma amostra representativa da semente do evento de soja MON 87708 foi depositada de acordo com o Tratado de Budapeste com a finalidade de permitir a invenção. O repositório selecionado para receber o depósito é o American Type Culture Collection (ATCC) tendo um endereço em 801 University Boulevard, Manassas, Virginia USA, Zip Code 20110. O repositório ATCC atribuiu o acesso No. PTA-9670 à semente do evento MON 87708.

[0051] A invenção fornece um micro-organismo compreendendo uma molécula de DNA tendo a SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 presentes no seu genoma. Um exemplo de tal micro-organismo é uma célula vegetal transgênica. Micro-organismos, tais como uma célula vegetal da invenção, são úteis em muitas aplicações industriais, incluindo, mas não limitados a: (i) uso como instrumento de pesquisa para questio-

namento científico ou pesquisa industrial; (ii) uso na cultura para produzir carboidrato endógeno ou recombinante, lipídio, ácido nucleico, ou produtos proteicos ou pequenas moléculas que podem ser usadas para pesquisa científica subsequente ou como produtos industriais; e (iii) uso com técnicas modernas de cultura de tecido vegetal para produzir plantas transgênicas ou culturas de tecido vegetal que então podem ser usadas para pesquisa agrícola ou produção. A produção e uso de micro-organismos, tais como células vegetais transgênicas utilizam técnicas microbiológicas modernas e intervenção humana para produzir um micro-organismo artificial, único. Neste processo, DNA recombinante é inserido no genoma de uma célula vegetal para criar uma célula vegetal transgênica que é separada e única de células vegetais de ocorrência natural. Esta célula vegetal transgênica então pode ser cultivada muito similarmente a bactérias e células de levedura usando técnicas modernas de microbiologia e pode existir em um estado não diferenciado, unicelular. A composição genética da nova célula vegetal e o fenótipo é um efeito técnico criado pela integração de DNA heterólogo no genoma da célula. Outro aspecto da invenção é um método de uso de um micro-organismo da invenção. Os métodos de uso de micro-organismos da invenção, tais como células vegetais transgênicas, incluem (i) métodos de produção de células transgênicas integrando DNA recombinante no genoma da célula e em seguida usando esta célula para derivar células adicionais que possuem o mesmo DNA heterólogo; (ii) métodos de cultura de células que contêm DNA recombinante usando técnicas modernas de microbiologia; (iii) métodos de produção e purificação de carboidrato, lipídio, ácido nucleico endógeno ou recombinante, ou produtos proteicos de células cultivadas; e (iv) métodos de uso de técnicas de cultura modernas do tecido vegetal com células vegetais transgênicas para produzir plantas transgênicas ou culturas de tecido vegetal transgênico.

[0052] As plantas da invenção podem passar ao longo de DNA de evento, incluindo o transgene, à progênie. Como usado neste pedido, "progênie" inclui qualquer planta, semente, célula vegetal, e/ou parte vegetal regenerável compreendendo DNA de evento derivado de uma planta ancestral e/ou um polinucleotídeo tendo pelo menos uma das sequências fornecidas como a SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2. Plantas, progênie e sementes podem ser homozigotas ou heterozigotas para o transgene. A progênie pode ser cultivada a partir de sementes produzidas por uma planta do evento de soja MON 87708 e/ou a partir de sementes produzidas por uma planta fertilizada com o pólen de uma planta do evento de soja MON 87708.

[0053] As plantas da progênie podem ser autopolinizadas (também conhecido como "autopolinização") para gerar uma linha de melhoramento verdadeira de plantas, *isto é*, plantas homozigotas para o transgene. Autopolinização da progênie apropriada pode produzir plantas que são homozigotas para ambos adicionados, genes exógenos.

[0054] Alternativamente, as plantas da progênie podem ser cruzadas exogenamente, *por exemplo*, produzidas com outra planta não relacionada, para produzir um varietal ou uma semente híbrida ou planta. Outra planta não relacionada pode ser transgênica ou não transgênica. Um varietal ou semente híbrida ou planta da invenção pode ser, dessa forma, derivada cruzando um primeiro parental que necessita de DNA específico e único do evento de soja MON 87708 com um segundo evento de soja de compreensão parental MON 87708, resultando em um híbrido compreendendo DNA específico e único do evento de soja MON 87708. Cada parental pode ser um híbrido ou um inato/varietal, contanto que o cruzamento ou melhoramento resultem em uma planta ou semente da invenção, *isto é*, uma semente tendo pelo menos um alelo contendo DNA específico e único do evento de soja MON 87708 e/ou SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2. Duas plantas trans-

gênicas diferentes podem ser acasaladas dessa forma para produzir descendência híbrida contendo dois genes exógenos independentemente de segregação adicionados. Por exemplo, soja MON 87708 tolerante à dicamba pode ser cruzada com outra planta de soja transgênica para produzir uma planta que tenha as características de ambos os parentais transgênicos. Um exemplo disto seria um cruzamento de soja MON 87708 tolerante à dicamba com uma planta tendo um ou mais traços adicionais, tais como tolerância a herbicidas (*por exemplo*, evento de soja 40-3-2 ou evento de soja MON89788 (Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 20060282915)), controle de insetos (*por exemplo*, evento de soja MON87701 (Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 20090130071)), e/ou outros traços desejáveis (*por exemplo*, composição de óleo aumentada, tais como evento de soja MON87769 (Publicação de Patente PCT WO2009102873)), resultando em uma planta de progênie ou semente que é tolerante à dicamba e tem um ou mais traços adicionais. Herbicidas para os quais a tolerância vegetal transgênica foi demonstrada e o método da invenção podem ser aplicados, incluir mas não são limitados a: herbicidas glifosato, glufosinato, sulfonilureias, imidazolinonas, bromoxinil, delapon, ciclo-hexanodioano, inibidores de protoporfirionogênio oxidase, e isoxasflutol. As moléculas de nucleotídeo que codificam proteínas envolvidas na tolerância a herbicidas são conhecidas na técnica e incluem, mas não são limitadas a, uma codificação de molécula de nucleotídeo: sintase 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato tolerante a glifosato (EPSPS) (*vide*, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.627.061; 5.633.435; 6.040.497; 5.094.945; 5.804.425; 6.248.876; 7.183.110; RE39.247); glifosato oxidoredutase (GOX) (ver, por exemplo, Patente U.S. No. 5.776.760); glifosato-n-acetiltransferase (GAT); uma acetolactato sintase tolerante ao herbicida (ALS, também conhecido como aceto-hidroxiácido sintase (AHAS)) para tolerância a sulfonilureias, imidazolinonas, triazolopirimi-

dinas, pirimidinil oxibenzoatos, sulfonilamino carbonil triazolinonas, e/ou éteres de heteroarila; uma coenzima acetil carboxilase A tolerante à herbicida (ACCase) ou R-2,4-diclorofenoxipropionato dioxigenase (rdpA) para tolerância a um ariloxifenoxipropionato (AOPP) (tal como haloxifop, quizalofop, diclorofop, e diclofop); uma proteína de desintoxicação, tal como uma 2,4-D dioxigenase (tfdA), R-2,4-diclorofenoxipropionato dioxigenase (rdpA), AriloxiAlcanoato Dioxigenase (AAD), e/ou S-2,4-dichorprop dioxigenase (sdpA) para tolerância a herbicidas de auxina sintética; uma bromoxinil nitrilase (Bxn) para tolerância a Bromoxinil (*ver*, por exemplo, Patente U.S. No. 4.810.648); uma fitoeno desaturase (crtl) para tolerância a norflurazon; resistência a bialafos (bar) ou proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT) (*ver*, por exemplo, Patente U.S. No. 5.646.024 e 5.276.268) para a tolerância a glufosinato e bialafos; e uma proteína para tolerância ao herbicida tricetona (mezotriona, tembotriona, topromezona, isoxazol), tal como tolerante à 4-HidroxiFenilPiruvato Dioxigenase (HPPD), um citocromo detoxificante P450, ou desvio via HPPD, tal como HPP oxidase de *Artbrobacter globiformis* (HPPO) e 4-HPA 1-hidroxilase de *Pseudomonas acidovorans* (HPAH) e NADH oxidoreductase (HPAC).

[0055] Retrocruzamento para uma planta parental e cruzamento exogâmico com uma planta não transgênica também são contemplados, como é a propagação vegetativa. Descrições de outros métodos de melhoramento que são comumente usados para traços diferentes e colheitas podem ser encontradas em uma de várias referências, *por exemplo*, Fehr, em *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

[0056] A invenção fornece uma parte vegetal que é derivada do evento de soja MON 87708. Como usado neste pedido, uma "parte vegetal" refere-se a qualquer parte de uma planta que é compreendida do material derivado de uma planta do evento de soja MON 87708. As

partes vegetais incluem, mas não são limitadas a pólen, óvulo, vagem, flor, tecido de raiz ou tronco, fibras, e folhas. As partes vegetais podem ser viáveis, não viáveis, regeneráveis, e/ou não regeneráveis.

[0057] A invenção fornece um produto que é derivado do evento de soja MON 87708. Como usado neste pedido, um "produto" refere-se a qualquer composição ou produto que é compreendido do material derivado de uma planta do evento de soja MON 87708, semente, célula vegetal, ou parte vegetal. Os produtos podem ser vendidos a consumidores e podem ser viáveis ou não viáveis. Os produtos não viáveis incluem, mas não são limitados a, sementes não viáveis e grãos; sementes processadas, partes de semente, e partes vegetais; tecido vegetal desidratado, tecido vegetal congelado, e tecido vegetal processado; sementes e partes vegetais processadas para forragem de consumo de animais terrestres e/ou aquáticos, óleo, farinha fina, farinha, flocos, farelo de cereais, fibra, leite, queijo, papel, creme, vinho, e qualquer outro alimento de consumo humano; e biomassas e produtos de combustível. Produtos viáveis incluem, mas não são limitados a, sementes e células vegetais. O evento de soja MON 87708 pode ser, dessa forma, usado para manufaturar qualquer produto tipicamente obtido da soja. Qualquer tal produto que é derivado do evento de soja MON 87708 pode conter pelo menos uma quantidade detectável de DNA específico e único correspondente ao evento de soja MON 87708, e especificamente pode conter uma quantidade detectável de um polinucleotídeo contendo pelo menos 15 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2. Qualquer método padrão da detecção de moléculas de nucleotídeo pode ser usado, incluindo métodos para detecção descrita neste pedido. Um produto está dentro dos limites da invenção se houver alguma quantidade detectável da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2 no produto.

[0058] As plantas, progênie, sementes, células vegetais, partes

vegetais (tais como pólen, óvulo, vagem, flor, tecido de raiz ou tronco, e folhas), e produtos da invenção são, por isso, úteis para, entre outras coisas, cultura de plantas para fins de produção de semente e/ou partes vegetais do evento de soja MON 87708 para fins agrícolas, produzindo progênie do evento de soja MON 87708 para fins de pesquisa e melhoramento vegetal, usam com técnicas microbiológicas para industrial e aplicações de pesquisa, e venda a consumidores.

[0059] A invenção fornece métodos para controle de ervas daninhas e métodos para produzir plantas usando herbicida dicamba e evento de soja MON 87708. Um método para controle de ervas daninhas em um campo é fornecido e consiste em plantar o evento de soja MON 87708 varietal ou plantas híbridas em um campo e aplicar uma dose herbicidicamente eficaz de dicamba ao campo para fins de controle de ervas daninhas no campo sem prejudicar as plantas MON 87708. Tal aplicação do herbicida dicamba pode ser pré-emergência, *isto é*, qualquer tempo após, a semente MON 87708 é plantada e antes das plantas MON 87708 exteriorizarem, ou pós-emergência, *isto é*, qualquer tempo após MON 87708 plantas exteriorizarem. Um outro método para controle de ervas daninhas em um campo também é fornecido e consiste em aplicar uma dose eficaz do herbicida dicamba para controle de ervas daninhas em um campo e em seguida plantar o evento de soja MON 87708 no campo. Tal aplicação do herbicida dicamba seria pré-plantação, *isto é*, antes da semente MON 87708 ser plantada, e pode ser feita qualquer tempo de pré-plantação incluindo, mas não limitado a, aproximadamente 14 dias de pré-plantação a aproximadamente 1 dia de pré-plantação. A invenção também fornece um método para produção de semente de soja essencialmente sem as sementes de espécies de ervas daninhas tóxicas plantando as sementes da variedade de soja tolerante dicamba MON 87708 em um campo, aplicando uma dose eficaz pós-emergência do herbicida dicamba suficiente para eliminar as

espécies de ervas daninhas tóxicas ao campo, e coletando as semente do campo. Uma dose herbicidamente eficaz de dicamba do uso no campo deve consistir em uma faixa de aproximadamente 0,0023 Kg (0,005 libras) por acre a aproximadamente 3,63 Kg (8 libras) de dicamba por acre ao longo de uma estação de crescimento. Múltiplas aplicações de dicamba podem ser usadas ao longo de uma estação de crescimento, por exemplo, duas aplicações (tais como uma aplicação pré-plantação e uma aplicação pós-emergência ou uma aplicação pré-emergência e uma aplicação pós-emergência) ou três aplicações (tais como uma aplicação pré-plantação, uma aplicação pré-emergência e uma aplicação pós-emergência).

[0060] Métodos para produção de uma planta de soja tolerante a herbicida compreendendo as sequências de DNA específicas e únicas para o evento transgênico MON 87708 da invenção são fornecidos. Plantas transgênicas usadas nestes métodos podem ser homozigotas ou heterozigotas para o transgene. As plantas de progênie produzidas por estes métodos podem ser varietais ou plantas híbridas; podem ser cultivadas de sementes produzidas por uma planta do evento de soja MON 87708 e/ou de sementes produzidas por uma planta fertilizada com o pólen de uma planta do evento de soja MON 87708; e podem ser homozigotas ou heterozigotas para o transgene. As plantas de progênie podem ser posteriormente autopolinizadas para gerar uma linhagem de melhoramento verdadeira de plantas, *isto é*, plantas homozigotas para o transgene, ou alternativamente podem ser cruzadas exogamicamente, *por exemplo*, produzido com outra planta não relacionada, para produzir um varietal ou uma semente ou planta híbridas.

[0061] Uma planta de soja que tolera a aplicação do herbicida dicamba pode ser produzida cruzando sexualmente uma planta do evento MON 87708 compreendendo uma molécula de nucleotídeo compreendendo a sequência da SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 com

outra planta de soja e por meio disso produz semente, que então é cultivada em plantas de progênie. Estas plantas de progênie então podem ser tratadas com o herbicida dicamba para selecionar para plantas de progênie que são tolerantes ao herbicida dicamba. Alternativamente, estas plantas de progênie podem ser analisadas usando métodos diagnósticos para selecionar para plantas de progênie que contêm o evento MON 87708 DNA. Outra planta usada no cruzamento pode ou pode não ser tolerante ao herbicida dicamba e pode ou não ser transgênica. A planta de progênie e/ou semente produzida podem ser varietal ou semente híbrida. Na prática deste método, a etapa de cruzar sexualmente uma planta com outra planta, *isto é*, polinização cruzada, pode ser realizada ou facilitada pela intervenção humana, por exemplo: por mãos humanas que coletam o pólen de uma planta e contatam este pólen com o estilo ou estigma de uma segunda planta; por mãos humanas e/ou remoção de ações, destruição, ou cobertura do estame ou anteras da planta (*por exemplo*, pelodespendoamento ou pela aplicação de um gametocida químico) para que a autopolinização natural seja prevenida e a polinização cruzada teria que realizar-se para a fertilização ocorrer; pela colocação humana de insetos polinizantes em uma posição de "polinização direcionada" (*por exemplo*, colocando colmeias em pomares ou campos ou pelo aprisionamento de plantas com insetos polinizantes); por abertura humana ou remoção de partes da flor para permitir a colocação ou contato do pólen estranho no estilo ou mácula (*por exemplo*, na soja que naturalmente tem flores que impedem ou previnem a polinização cruzada, tornando-as naturalmente autopolinizantes obrigatórias sem intervenção humana); por colocação seletiva de plantas (*por exemplo*, plantas intencionalmente plantadas em proximidade polinizante); e/ou pela aplicação de produtos químicos para precipitar a florescência ou criar a receptividade (da mácula do pólen).

[0062] Uma planta de soja que tolera a aplicação do herbicida dicamba pode ser produzida por autopolinização de uma planta do evento MON 87708 compreendendo uma molécula de nucleotídeo compreendendo a sequência da SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2 e por meio disso produz a semente, que então é cultivada em plantas de progênie. Estas plantas de progênie então podem ser tratadas com o herbicida dicamba para selecionar para plantas de progênie que são tolerantes ao herbicida dicamba. Alternativamente, estas plantas de progênie podem ser analisadas usando métodos diagnósticos para selecionar para plantas de progênie que contêm o evento MON 87708 DNA. Na prática deste método, a etapa de cruzamento sexuada de uma planta com ela mesma, isto é, autopolinização, pode ser realizada ou facilitada pela intervenção humana, por exemplo: por mãos humanas que coletam o pólen da planta e contatam este pólen com o estilo ou mácula da mesma planta e em seguida opcionalmente previnem fertilização adicional da planta; por mãos humanas e/ou remoção de ações, destruição, ou cobertura do estame ou anteras de outras plantas próximas (*por exemplo*, pelo despendoamento ou pela aplicação de um gametocida químico) para que a polinização cruzada natural seja prevenida e a autopolinização teria que realizar-se para a fertilização ocorrer; pela colocação humana de insetos polinizantes em uma posição de "polinização direcionada" (*por exemplo*, pelo aprisionamento de uma planta sozinha com insetos polinizantes); pela manipulação humana da flor ou suas partes para permitir à autopolinização; por colocação seletiva de plantas (*por exemplo*, intencionalmente plantando plantas além de proximidade polinizante); e/ou pela aplicação de produtos químicos para precipitar a florescência ou criar a receptividade (da mácula do pólen).

[0063] As plantas de soja da progênie e as sementes englobadas por estes métodos e produzidas usando estes métodos serão distintas

de outras plantas de soja, por exemplo, porque as plantas de soja de progênie e sementes são recombinantes e como tais criadas por intervenção humana; são tolerantes ao herbicida dicamba; contêm pelo menos um alelo que consiste no DNA de transgene da invenção; e/ou contêm uma quantidade detectável de uma sequência de polinucleotídeos selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2. Uma semente pode ser selecionada a partir de uma planta de progênie individual, e contanto que a semente compreenda a SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, estará dentro do escopo da invenção.

[0064] Na prática da invenção, duas plantas transgênicas diferentes podem ser cruzadas para produzir a descendência híbrida que contém dois genes heterólogos independentemente segregantes. Autopolinização da progênie apropriada pode produzir plantas que são homozigotas para ambos os genes. O retrocruzamento a uma planta parental e cruzamento exogâmico com uma planta não transgênica também é contemplado, como é a propagação vegetativa. As descrições de outros métodos que são comumente usados para traços diferentes e colheitas podem ser achadas em uma de várias referências, *por exemplo*, Fehr, em *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

[0065] As plantas e as sementes usadas nos métodos descritos neste pedido também podem conter um ou mais transgenes adicionais. Tal transgene pode ser qualquer sequência nucleotídica que codifica uma proteína ou a molécula de RNA conferindo um traço desejável incluindo, mas não limitado à, resistência a insetos aumentada, eficiência aumentada de uso de água, desempenho de rendimento aumentado, resistência aumentada à seca, qualidade de semente aumentada, qualidade nutritiva melhorada e/ou tolerância aumentada a herbicidas, na qual o traço desejável é medido com respeito a uma planta de soja sem tal transgene adicional.

[0066] Os métodos da invenção são, por isso, úteis para, entre outras coisas, controle de ervas daninhas em um campo ao cultivar plantas para fins de produção de semente e/ou partes vegetais do evento de soja MON 87708 para fins agrícolas ou de pesquisa, seleção para a progênie do evento de soja MON 87708 para fins de pesquisa ou melhoramento vegetal, e produção de plantas de progênie e sementes do evento de soja MON 87708.

[0067] As plantas, progênie, sementes, células vegetais, partes vegetais (tais como pólen, óvulo, vagem, flor, tecido de raiz ou tronco, e folhas), e produtos da invenção podem ser avaliados para composição de DNA, expressão gênica, e/ou expressão proteica. Tal avaliação pode ser feita usando qualquer método padrão, tal como PCR, northern blotting, Southern blotting, western blotting, imunoprecipitação, e ELISA ou usando os métodos da detecção e/ou os kits de detecção fornecidos neste pedido.

[0068] Métodos para detecção da presença de DNA derivado de uma célula, tecido, semente, ou planta de soja do evento de soja MON 87708 em uma amostra são fornecidos. Um método consiste em (i) extração de uma amostra de DNA de pelo menos uma célula, tecido, semente, ou planta de soja, (ii) contatar a amostra de DNA com um par de iniciadores que é capaz de produzir um amplicon a partir do evento MON 87708 DNA sob condições apropriadas para a amplificação de DNA, (iii) execução de uma reação de amplificação de DNA, e em seguida (iv) detecção da molécula de amplicon e/ou confirmação que a sequência nucleotídica do amplicon compreende uma sequência nucleotídica específica para o evento MON 87708, tal como um selecionado a partir do grupo consistindo na SEQ ID NO: 1-8. O amplicon deve ser aquele que é específico para o evento MON 87708, tal como um amplicon que compreenda a SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2. A detecção de uma sequência nucleotídica específica para o evento

MON 87708 no amplicon é determinativa e/ou diagnóstica para a presença de DNA específico do evento de soja MON 87708 na amostra. Um exemplo de um par de iniciadores que é capaz de produzir um amplicon de DNA do evento MON 87708 sob condições apropriadas para a amplificação de DNA é fornecido como a SEQ ID NO: 10-11. Outros pares de iniciadores podem ser prontamente projetados por um com habilidade na técnica e compreenderiam pelo menos um fragmento da SEQ ID NO: 6. Outro método para detectar a presença de DNA derivado de uma célula, tecido, semente, ou planta de soja do evento de soja MON 87708 em uma amostra consiste em (i) extração de uma amostra de DNA de pelo menos uma célula, tecido, semente, ou planta de soja, (ii) contatar a amostra de DNA com uma sonda de DNA específica para o evento MON 87708 DNA, (iii) permitir que a sonda e a amostra de DNA hibridizem sob condições estridentes de hibridização, e em seguida (iv) detecção da hibridização entre a sonda e a amostra de DNA alvo. Um exemplo da sequência de uma sonda de DNA que é específica para o DNA do evento MON 87708 é fornecido como a SEQ ID NO: 11. Outras sondas podem ser prontamente projetadas por um versado na técnica e compreenderiam pelo menos um fragmento da SEQ ID NO: 6. A detecção da hibridização da sonda à amostra de DNA é diagnóstica para a presença do DNA específico de soja do evento MON 87708 na amostra. A ausência da hibridização é alternativamente diagnóstica da ausência do DNA específico de soja do evento MON 87708 na amostra.

[0069] Os kits de detecção de DNA são fornecidos para que sejam úteis para a identificação do DNA de soja do evento MON 87708 em uma amostra e também podem ser aplicados a métodos para produzir plantas de soja que contêm DNA do evento apropriado. Tais kits contêm iniciadores de DNA e/ou sondas que compreendem os fragmentos de SEQ ID NO: 1-8. Um exemplo de tal kit compreende pelo menos uma

molécula de DNA de comprimento suficiente de nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 6 para funcionar como uma sonda de DNA útil para detectar a presença e/ou ausência de DNA derivado de soja do evento transgênico MON 87708 em uma amostra. O DNA derivado de soja do evento transgênico MON 87708 compreenderia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 e/ou SEQ ID NO: 8. Uma molécula de DNA suficiente para o uso como uma sonda de DNA é fornecido para que seja útil para determinação, detecção, ou diagnóstico da presença e/ou a ausência do DNA derivado de soja do evento MON 87708 em uma amostra é fornecido como a SEQ ID NO: 11. Outras sondas podem ser prontamente projetadas por um com habilidade na técnica e devem compreender pelo menos 15 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 6 e ser suficientemente únicas para o DNA derivado de soja do evento MON 87708 a fim de identificar o DNA derivado do evento. Outro tipo de kit compreende um par de iniciadores útil para produzir um amplicon útil para detectar a presença e/ou a ausência de DNA derivado de soja do evento transgênico MON 87708 em uma amostra. Tal kit empregaria um método que compreende contatar uma amostra de DNA alvo com um par de iniciadores como descrito neste pedido, então realizar uma reação de amplificação de ácidos nucleicos suficiente para produzir um amplicon compreendendo SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 e/ou SEQ ID NO: 8, e logo detectar a presença e/ou ausência do amplicon. Tal método também pode incluir o sequenciamento do amplicon ou de um fragmento do mesmo, que seria determinativo, *isto é*, de diagnóstico para, a presença do DNA derivado de soja do evento MON 87708 na amostra de DNA alvo. Outros pares de iniciadores podem ser prontamente projetados por um com habilidade na técnica e devem compreender pelo menos 15 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 6 e ser suficientemente únicos para o DNA derivado de soja do evento MON 87708 a fim de identificar o DNA derivado do evento.

[0070] A amplificação de ácido nucléico pode ser realizada por qualquer um dos vários métodos de amplificação de ácidos nucléicos conhecidos na técnica, incluindo métodos térmicos de amplificação. Muitas técnicas são conhecidas na técnica para detecção, quantificação, e/ou sequenciamento do amplicon produzido por estes métodos. Uma técnica exemplar útil na prática desta invenção é TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

[0071] Os kits e os métodos de detecção da invenção são úteis para, entre outras coisas, identificar o evento de soja MON 87708, selecionar variedades vegetais ou híbridas que compreendem o evento de soja MON 87708, detectar a presença de DNA derivado de soja do evento transgênico MON 87708 em uma amostra, e monitorar as amostras para presença e/ou ausência do evento de soja MON 87708 ou partes vegetais derivadas do evento de soja MON 87708.

[0072] A sequência do inserto de DNA heterólogo, as sequências de ligação, ou as sequências que flanqueiam do evento de soja MON 87708 (com amostras de semente representativas depositadas como ATCC PTA-9670) podem ser verificadas (e corrigidas se necessário) amplificando tais sequências do evento usando iniciadores derivados das sequências fornecidas neste pedido seguido pelo sequenciamento de DNA padrão do amplicon ou do DNA clonado.

[0073] Como usado neste pedido, o termo "compreendendo" significa "incluindo, mas não limitado a".

[0074] Os seguintes exemplos estão incluídos para demonstrar exemplos de certas modalidades preferenciais da invenção. Deve ser apreciado por aqueles com habilidade na técnica que as técnicas descritas nos exemplos que seguem representam abordagens que os inventores encontraram funcionar bem na prática da invenção, e dessa forma podem ser considerados constituir exemplos de modos preferenciais para sua prática. Entretanto, aqueles com habilidade na técnica, na luz da

presente revelação, devem apreciar que muitas modificações podem ser feitas nas modalidades específicas que são descritas e ainda obtêm um resultado parecido ou similar sem partir o espírito e escopo da invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Transformação de Soja A3525 e seleção de evento MON 87708

[0075] A planta de soja MON 87708 foi produzida pela transformação de soja mediada por *Agrobacterium*. As células de soja foram transformadas e regeneradas em plantas de soja intactas e as plantas individuais foram selecionadas a partir da população de plantas que mostrou integridade do cassete de expressão vegetal e resistência à dicamba. Desta população, evento de planta de soja MON 87708 foi selecionado e caracterizado.

[0076] A planta transgênica de soja MON 87708 tolerante à dicamba foi desenvolvida pela transformação mediada por *Agrobacterium* do tecido meristemal de soja utilizando vetor de transformação PV-GMHT4355. O método foi descrito na Patente U.S. No. 6.384.301 (neste pedido incorporada por referência), que permite a geração de plantas transformadas sem utilização de calo. Resumidamente, os tecidos meristemais foram extirpados dos embriões da semente de soja A3525 germinada (Asgrow, St Louis, MO). Após cocultivo com vetor carreando *Agrobacterium*, os meristemas foram colocados em meio de seleção contendo glifosato (Monsanto, St Louis, MO), sal dissódico de carbenicilina, sal sódico de cefotaxima e mistura sal dissódico de ticarcilina/ clavulanato de potássio para inibir o crescimento de células vegetais não transformadas e com *Agrobacterium* excessiva. Os meristemas então foram colocados em meios condutivos para desenvolvimento de galhos e raízes. Plantas radiculadas com características fenotípicas normais foram selecionadas e transferidas para o solo para crescimento e avaliação adicionais.

[0077] As plantas R0 geradas pela transformação acima mencionada foram transferidas para o solo para crescimento e logo autofecundadas para produzir a semente R1. Durante a autofecundação subsequente das plantas R0 para produzir a geração R1, as inserções não ligadas de T-DNA I (cassete de expressão *dmo*) e T-DNA II (cassete de expressão *cp4 epsps*) foram segregadas. Uma dose não letal de glifosato foi aplicada às plantas R1. Plantas com injúrias menores foram selecionadas para análises adicionais, ao passo que plantas que não apresentaram injúria, isto é, contendo T-DNA II (cassete de *cp4 epsps* expressão) foram eliminadas do desenvolvimento subsequente. Posteriormente, plantas R0 contendo somente um único inserto T-DNA (isto é, cassete gênico *dmo*) foram identificadas. O cassete de expressão T-DNA I compreendeu promotor de Peanut Clorotic Streak Vírus (PCISV) com uma região potencializadora duplicada (P-PCISV.FLT-enh); operacionalmente ligado a um líder de DNA derivado do transcrito de RNA de Tobacco Etch Vírus (L-TEV); operacionalmente ligado a uma molécula de DNA que codifica N-terminal de peptídeo trânsito de cloroplasto a partir da subunidade menor da carboxilase 1,5-bisfosfato ribulose (SSU) de *Pisum sativum* (TS-RbcS-3C); operacionalmente ligado a parte da proteína madura de subunidade menor da carboxilase 1,5-bisfosfato ribulose (SSU) de *Pisum sativum* (CR-RbcS-3C); operacionalmente ligado a uma molécula de DNA que codifica um mono-oxigenase dicamba (DMO) de *Stenotrophomonas maltophilia* (*Pseudomonas maltophilia* foi o nome original da fonte do gene DMO. Este organismo fonte foi posteriormente reclassificado primeiro como *Xanthomonas maltophilia* e logo depois como *Stenotrophomonas maltophilia*); operacionalmente ligado a uma 3' UTR da molécula de DNA derivada do gene da subunidade menor da carboxilase 1,5-bisfosfato ribulose de *Pisum sativum* (T-Ps. RbcS2-E9). As plantas foram selecionadas por uma combinação de técnicas analíticas, incluindo TaqMan, análise por PCR e pulverização de herbicida. O evento MON 87708 foi seleci-

onado entre aproximadamente 2.400 eventos transgênicos individuais baseados nas suas características fenotípicas superiores, uma análise de perfil molecular abrangente, e sua associação com haplótipo desejável. O Evento MON 87708 então foi cruzado com o evento MON 89788 (tolerante a glifosato). A progênie deste cruzamento foi tratada com dicamba (Clarity®, BASF, Research Triangle Park, NC), glifosato (Roundup WeatherMAX®, Monsanto Co, St Louis, MO), ou uma combinação de dicamba e glifosato. Os tratamentos foram feitos em estágio de crescimento vegetativo 3 (V3) pré-plantar, pós-plantar, e pós-plantar no estágio de reprodução 1 (R1). As plantas tratadas foram classificadas quanto ao percentual de inibição de crescimento em 14 dias após o tratamento (DAT) para o tratamento com herbicida pré-plantar, 3 DAT para o tratamento pós-emergência no estágio VE, e tratamento 3 DAT pós-emergência no estágio R1. O herbicida(s) foi aplicado em várias proporções por acre como mostrado na Tabela 1. As medidas percentuais de inibição representam uma média das repetições.

Tabela 1: Teste de tolerância à Dicamba e/ou Roundup WeatherMAX® com MON89788 x MON 87708

Herbicida (a.e. Taxa gm/ha (lb/a))	% de inibição em 14 DAT PRÉ	% de inibição em 3 DAT PÓS (V3)	% de inibição em 3 DAT PÓS (R1)
Não tratado/Sem herbicida	0,0	0,0	0,0
Roundup WeatherMAX® (3364 (3.0))	0,0	0,0	0,0
Clarity® (2244 (2.0))	0,0	10,0	20,0
Clarity®561 (0.5) e Roundup WeatherMAX® (841 (0.75))	0,0	5,0	10,0
Clarity® (1120 (1.0)) e Roundup WeatherMAX® (1682 (1.5))	0,0	7,5	12,5
Clarity® (2244 (2.0)) e Roundup WeatherMAX® (3364 (3.0))	0,0	22,5	25,0

[0078] O transgene de tolerância à dicamba foi mapeado no evento de soja MON 87708 para ligação ao grupo 9 aproximadamente na posição 143,5 do mapa. A janela haplotípica 19743 e 19767 associada não tem nenhum efeito sobre rendimento, maturidade, altura ou acamamento. A informação sobre associação haplotípica é fornecida na Tabela 2 onde GM_A92205 indica o evento MON 87708.

Tabela 2: Associação haplotípica LG9, Pos 143',5

Evento	Janela haplotípica	HaplótipoID	Rendimen- to	Maturidade	Altura	Acamamen- to	Sequência haplotípica	Grupo de liga- ção
GM_A92205	19743	1573355	0,00	-0,03	0,06	0,04	CGCTG	9
GM_A92205	19743	1573357	0,00	0,07	-0,03	-0,04	CGCTA	9
GM_A92205	19743	1573371	0,00	-0,09	-0,41	-0,09	CCCTG	9
GM_A92205	19743	1573373	0,00	-0,20	-0,01	-0,03	TG*GG	9
GM_A92205	19743	1573374	0,00	-0,08	-0,07	0,05	TG*GA	9
GM_A92205	19743	1573375	0,00	-0,15	0,05	0,04	CCCTA	9
GM_A92205	19743	1573376	0,00	-0,45	-0,14	0,00	TC*GG	9
GM_A92205	19767	1573486	0,00	0,00	-0,03	0,00	TACGGTC	9
GM_A92205	19767	1573493	0,00	0,00	0,22	0,00	AACAATT	9
GM_A92205	19767	1573494	0,00	0,00	0,03	0,00	TACAATC	9
GM_A92205	19767	1573495	0,00	0,00	0,07	0,00	TGAAACC	9
GM_A92205	19767	1573497	0,00	0,00	0,41	0,00	TACGGTT	9
GM_A92205	19767	1573499	0,00	0,00	-0,01	0,00	TGAAACT	9
GM_A92205	19767	1573500	0,00	0,00	0,06	0,00	TGAGACC	9
GM_A92205	19767	1573502	0,00	0,00	-0,07	0,00	AACAATC	9
GM_A92205	19767	1573503	0,00	0,00	0,08	0,00	AACGATC	9
GM_A92205	19767	1573504	0,00	0,00	0,07	0,00	TACAGTC	9
GM_A92205	19767	1573506	0,00	0,00	-0,03	0,00	AACGATT	9
GM_A92205	19767	1573507	0,00	0,00	0,20	0,00	TGAAATT	9

Exemplo 2: Caracterização das sequências de DNA de MON 87708

[0079] O DNA inserido no genoma da planta de soja MON 87708 e a sequência flanqueadora foram caracterizados por análises moleculares detalhadas. Estas análises incluíram: a sequência do inserto, o número de insertos (número de sítios de integração dentro do genoma da soja), o número de cópias (número de cópias de DNA transgênico dentro de um *locus*), a integridade do cassete gênico inserido, as sequências que flanqueiam, e a associação da inserção com regiões de haplótipo do genoma da soja.

[0080] Sondas moleculares de DNA que foram usadas incluíam a região de codificação intacta e seus respectivos elementos reguladores, os promotores, íntrons, e sequências de poliadenilação dos cassetes de expressão vegetais. A análise mostrou que MON 87708 contém uma inserção de DNA transgênico única com uma cópia do cassete de expressão. PCR inverso e as análises de sequência de DNA foram realizados para determinar as ligações 5' e 3' do inserto ao genoma da planta, confirmar a organização dos elementos dentro do inserto (Figura 1), e determinar a sequência completa de DNA do inserto na planta de soja MON 87708 (fornecido neste pedido como a SEQ ID NO: 5). Uma planta de soja que compreende no seu genoma os elementos genéticos ligados no transgene mostrados na Figura 1 e é resistente a dicamba é um aspecto da invenção.

[0081] As sequências que flanqueiam a inserção de DNA transgênico em MON 87708 foram determinadas usando PCR inverso como descrito em Ochman *et al.*, 1990 (PCR Protocols: A guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc) e/ou técnicas de passagem pelo genoma. O DNA genômico vegetal foi isolado tanto da linhagem A3525 como das linhagens de soja transgênicas do tecido cultivado sob condições de estufa padrão. Aproximadamente 1 grama do tecido de folha jovem foi combinado com nitrogênio líquido e preso a um pó

perfeito usando um morteiro e pilão. O DNA foi extraído usando um kit de extração de DNA genômico Nucleon® PhytoPure® (RPN8511, Amersham, Piscataway, NJ) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a etapa final de precipitação, o DNA foi ressuspense em 0,5 ml de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). Este método pode ser modificado por um versado na técnica para extrair DNA de qualquer tecido da soja, incluindo, mas não limitado a semente. Uma alíquota de DNA foi digerida com endonucleases de restrição selecionadas baseado na análise de restrição do DNA transgênico. Após auto-ligação dos fragmentos de restrição, PCR foi realizado usando iniciadores projetados da sequência de DNA transgênico que amplificaria sequências que se estendem das extremidades 5' e 3' do DNA transgênico. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose e purificados utilizando um kit de purificação de gel da QIAGEN (Qiagen, Valencia, CA). Os produtos de DNA subsequentes foram sequenciados diretamente usando protocolos de sequenciamento de DNA padrão. A sequência que flanqueia a extremidade 5' que se estende na borda direita da sequência do cassete de expressão do DNA transgênico é apresentada como a SEQ ID NO: 3 ([C], vide Figura 1). A sequência que flanqueia a extremidade 3' que se estende na borda esquerda da sequência do cassete de expressão do DNA transgênico é apresentada como a SEQ ID NO: 4 ([D], vide Figura 1). A porção de DNA do cassete de expressão que esteve totalmente integrado no DNA genômico de A3525 é apresentada como a SEQ ID NO: 5 ([E], vide Figura 1).

[0082] As sequências de molécula de DNA isoladas foram em comparadas com a sequência do DNA transgênico para identificar a sequência que flanqueia e o fragmento de DNA transgênico co-isolado. A confirmação da presença do cassete de expressão foi alcançada por PCR com iniciadores projetados baseado nos dados de-

duzidos de sequência flanquedora e a sequência de DNA transgênico conhecida. A sequência selvagem correspondente à mesma região na qual o DNA transgênico foi integrado na linhagem transformada foi isolada usando iniciadores projetados a partir das sequências que flanqueiam em MON 87708. As reações de PCR foram realizadas usando o sistema de amplificação Elongase® (Invitrogen, Carlsbad, CA). As sequências de DNA flanqueadoras em MON 87708 e a sequência selvagem de A3525 foram analisadas contra múltiplos bancos de dados de nucleotídeos e proteínas. Esta informação foi usada para examinar a relação do transgene com o genoma vegetal e procurar pela integridade do sítio de inserção. A sequência flanqueadora e as sequências de tipo selvagem foram usadas para projetar iniciadores para ensaios TAQMAN® usados para identificar os eventos. Os ensaios de zigosidade foram desenvolvidos usando esta informação.

Exemplo 3: Ensaios TAQMAN® ponto final específicos para evento.

[0083] Este exemplo descreve um método de amplificação térmica TAQMAN® ponto final específico para evento desenvolvido para identificar o evento MON 87708 em uma amostra. Exemplos de condições úteis para o método TAQMAN® Ponto final Específico para o evento MON 87708 são como se segue: Etapa 1: água 18 megohm ajustada para o volume final de 10 µl. Etapa 2: 5,0 µl Master Mix Universal 2X (dNTPs, enzima, tampão) para uma concentração final 1X. Etapa 3: 0,5 µl de Mix Iniciador de Evento-1 (SQ13570) e Iniciador de Evento-2 (SQ13571) (ressuspensos em água 18 megohm a uma concentração de 20 µM de cada iniciador) para a concentração final de 1,0 µM (por exemplo, em um tubo de microcentrifuga, para se alcançar 500 µl deve ser adicionado seguinte em uma concentração final de 20µM: 100 µl de Iniciador SQ13570 (SEQ ID NO: 9) em uma concentração de 100 µM; 100 µl de Iniciador SQ13571 (SEQ ID NO: 10) em uma concentração de 100 µM; 300 µl de água 18 megohm). Etapa 4: 0,2 µl de Sonda

Sonda PB4655 6-FAM[®] MGB (ressuspensos em água 18 megohm a uma concentração de 10 µM (SEQ ID NO: 11) para a concentração final de 0,2 µM. Etapa 5: 0,5 µl de Mistura de Iniciador de Controle Interno-1 e Iniciador de Controle Interno-2 (ressuspensos em água 18 megohm para uma concentração de 20 µM de cada iniciador) para uma concentração final de 1,0 µM. Etapa 6: 0,2 µl de Sonda Controle Interno VIC[™] a uma concentração final de 0,2 µM (ressuspensos em água 18 megohm para uma concentração de 10 µM) Etapa 7: 3,0 µl de DNA Extraído (molde) de cada amostra com uma cada uma das seguintes compreendendo 1. Amostras de Folha a ser analisadas; 2. Controle negativo (DNA não transgênico); 3. Controle negativo de água (nenhum molde); 4. Controle positivo DNA MON 87708. Etapa 8: Condições de Termociclador como se segue: Um Ciclo a 50°C por 2 minutos; Um Ciclo a 95°C por 10 minutos; Dez Ciclos de 95°C por 15 segundos então 64°C por 1 minuto com -1°C/ciclo; Trinta Ciclos de 95°C por 15 segundos então 54°C 1 minuto; ciclo final de 10°C.

[0084] Os iniciadores de DNA usados no ensaio de ponto final são os iniciadores SQ13570 (SEQ ID NO: 9), SQ13571 (SEQ ID NO: 10), e a sonda PB4655 marcada com 6-FAM[®] (SEQ ID NO: 11). 6-FAM[™] é um produto corante fluorescente da Applied Biosystems (Foster City, CA) ligado à sonda de DNA. Para sondas TAQMAN[®] MGB[™], a atividade de 5'exonuclease da Taq DNA polimerase cliva a sonda na extremidade de 5', entre o fluoróforo e supressor. Quando hibridizado à fita de DNA alvo, supressor e fluoróforo são separados o suficiente para produzir um sinal fluorescente, dessa forma liberando fluorescência. SQ13570 (SEQ ID NO: 9) e SQ13571 (SEQ ID NO: 10) quando usados nestes métodos de reação com PB4655 (SEQ ID NO: 11) produzem um amplicon de DNA que é diagnóstico para o DNA de evento MON 87708. Os controles desta análise devem incluir um controle positivo de soja contendo DNA de evento MON 87708, um controle negativo de soja

não transgênica, e um controle negativo que não contenha nenhum DNA molde. Adicionalmente, um controle da reação de PCR inclui Iniciadores de Controles Internos e uma Sonda de Controle Interno, específica para um gene de cópia única no genoma de Glicina. Um versado na técnica saberá como desenhar iniciadores específicos para um gene de cópia única no genoma de Glicina. Estes ensaios são otimizados para uso tanto com um termociclador Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 (funcionando na velocidade máxima) quanto com um MJ Research DNA Engine PTC-225. Outros métodos e aparelhos conhecido pelos versados na técnica que produzem amplicons que identificam o DNA do evento MON 87708 são abrangidos pela técnica.

[0085] Permitiu-se que plantas R0 que demonstraram a presença do cassete de expressão se desenvolvessem em plantas totalmente maduras. Sondas desenhadas com base nas sequências do cassete transgênico de tolerância à dicamba foram usadas para marcar Southern blots para determinar a ligação. As plantas R0 também foram avaliadas para o número de cópias do cassete de expressão usando uma combinação de análise por Southern e TAQMAN® ponto final.

[0086] Um ensaio de zigosidade é útil para determinar se uma planta compreendendo um evento é homozigota para DNA de evento; que está compreendendo DNA exógeno na mesma posição em cada cromossomo de um par cromossômico; ou heterozigoto para DNA de evento, que está compreendendo DNA exógeno em somente um cromossomo de um par cromossômico; ou é nulo para DNA de evento, que é selvagem. O método de amplificação térmica TAQMAN® ponto final também foi usado para desenvolver ensaios de zigosidade para o evento MON 87708. Este exemplo descreve um método de amplificação térmica TAQMAN® ponto final específico para evento desenvolvido para determinar a zigosidade do evento MON 87708 em uma amostra.

Para este ensaio, um ensaio três iniciadores foi empregado em que o iniciador SQ20632 (SEQ ID NO: 12) hibridiza e se estende especificamente da ligação 3' do DNA exógeno inserido e DNA genômico, o iniciador SQ20636 (SEQ ID NO: 13) hibridiza e estende-se especificamente do lado que flanqueia 3' o DNA do DNA exógeno inserido, e o iniciador SQ20637 (SEQ ID NO: 14) hibridiza e estende-se especificamente de DNA genômico no qual esteve integrado o DNA exógeno inserido. Os três iniciadores são diagnósticos para o evento. Neste exemplo, o iniciador SQ20636 (SEQ ID NO: 13) e o iniciador SQ20632 (SEQ ID NO: 12) e a sonda oligonucleotídica PB10130 marcada com 6-FAM® (SEQ ID NO: 15) são diagnósticos quando há uma cópia de DNA exógeno inserido. Neste exemplo, SQ20636 (SEQ ID NO: 13) e o iniciador SQ20637 (SEQ ID NO: 14) e a sonda oligonucleotídica PB10131 marcada com VIC™ (SEQ ID NO: 16) são diagnósticos quando não há nenhuma cópia presente do DNA exógeno inserido no DNA genômico, *isto é*, selvagem. Quando os três iniciadores e duas sondas são misturados em uma reação de PCR com DNA extraído de uma planta homozigota para o evento MON 87708, há um sinal fluorescente somente sonda oligonucleotídica PB10130 marcada com 6-FAM® (SEQ ID NO: 15) que é indicativo de diagnóstico de uma planta homozigota para o evento MON 87708. Quando os três iniciadores e duas sondas são misturados em uma reação de PCR com DNA extraído de uma planta heterozigota para o evento MON 87708, há um sinal fluorescente tanto da sonda oligonucleotídica PB10130 marcada com 6-FAM® (SEQ ID NO: 15) quanto da sonda oligonucleotídica PB10131 marcada com VIC™ (SEQ ID NO: 16) que é indicativo de diagnóstico uma planta heterozigota para o evento MON 87708. Quando os três iniciadores e duas sondas são misturados em uma reação de PCR com DNA extraído de uma planta que é nula para o evento MON 87708 (*isto é*, selvagem), há um sinal fluorescente somente da sonda

oligonucleotídica PB10131 marcada com VIC™ (SEQ ID NO: 16) que é indicativo de diagnóstico de uma nulidade vegetal do evento MON 87708, *isto é*, selvagem. Exemplos de condições úteis para este método são como se segue: Etapa 1: água 18 megohm ajustada para o volume final de 10 µl. Etapa 2: 5,0 µl Master Mix Universal 2X (Applied Biosystems cat # 4304437; dNTPs, enzima, tampão) para uma concentração final 1X. Etapa 3: 0,5 µl de Iniciadores de Zigosidade SQ20632, SQ20636, SQ20637 (ressuspensos em água 18 megohm a uma concentração de 20 µM de cada iniciador) para uma concentração final de 1,0 µM. Etapa 4: 0,2 µl de Sonda 6-FAM® PB10130 (SEQ ID NO: 15) (ressuspensos em água 18 megohm a uma concentração de 10 µM) para uma concentração final de 0,2 µM. Etapa 5: 0,2 µl Sonda VIC™ PB10131 (SEQ ID NO: 16) (ressuspensos em água 18 megohm a uma concentração de 10 µM) para uma concentração final 0,2 µM. Etapa 6: 3,0 µl de DNA Extraído (molde) de cada amostra com cada uma das seguintes compreendendo 1. As Amostras de Folha a serem analisadas (4-80 ng de DNA genômico diluídos em água); 2. Controle negativo (DNA de soja não transgênico; 4ng diluído em água); 3. Controle negativo em água (nenhum molde; solução na qual DNA foi ressuspenso); 4. Controle positivo de DNA genômico do evento MON 87708 heterozigoto conhecido (4 ng diluídos em água); 5. 4. Controle positivo de DNA genômico do evento MON 87708 homozigoto conhecido (4 ng diluídos em água). Etapa 7: Misturar delicadamente. Etapa 8: Condições do Termociclador usando os termocicladores Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 (funcionando com a velocidade máxima) ou MJ Research DNA Engine PTC-225 são como se segue: Um Ciclo a 50°C por 2 minutos; um ciclo a 95°C por 10 minutos; Dez Ciclos (de 95°C por 15 segundos então 64°C por 1 minuto (-1°C/ciclo); Trinta Ciclos (de 95°C por 15 segundos então 54°C por 1 minuto); 10 a 20 ciclos adicionais opcionais (95°C por 15 segundos

então 64°C por 1 minuto (-1°C/ciclo) pode fornecer separação demográfica mais distinta durante a análise Ponto final TaqMan®; Um ciclo a 10°C mantido.

Exemplo 4: Identificação de evento MON 87708 em qualquer atividade de melhoramento de MON 87708

[0087] O seguinte exemplo descreve como cada um pode identificar o evento MON 87708 dentro da progênie de qualquer atividade de melhoramento usando evento de soja MON 87708.

[0088] Os pares de iniciadores de evento de DNA são usados para produzir um diagnóstico de amplicon do evento de soja MON 87708. Um diagnóstico de amplicon de MON 87708 compreende pelo menos uma sequência de ligação, fornecida como a SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 8. Os pares de iniciadores do evento que produzirão um amplicon diagnóstico de MON 87708 incluem pares de iniciadores baseados nas sequências flanqueadoras e o cassete de expressão inserido. Para adquirir um amplicon diagnóstico no qual a SEQ ID NO: 1 é encontrada, projetar-se-ia uma molécula de iniciador de sentido direto baseada na SEQ ID NO: 3 de bases 1 a 1126 e uma molécula de iniciador de sentido reverso baseada na sequência de DNA de cassete de expressão inserida (SEQ ID NO: 5 a partir de posições 1 a 3003) no qual as moléculas de iniciadores são de comprimento suficiente de nucleotídeos contíguos para hibridizar especificamente à SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 5. Para adquirir um amplicon diagnóstico no qual a SEQ ID NO: 2 é encontrada, projetar-se-ia uma molécula de iniciador de sentido direto baseada na sequência de DNA de cassete de expressão inserida (SEQ ID NO: 5 a partir de posições 1 a 3003) e uma molécula de iniciador de sentido reverso baseada na sequência 3' flanqueadora (SEQ ID NO: 4 a partir de bases 131 a 1947), no qual as moléculas de iniciadores são de comprimento suficiente de nucleotídeos contíguos para hibridizar especifica-

mente à SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 5. Para fins práticos, deve-se projetar iniciadores que produzem amplicons de uma faixa de tamanho limitada, por exemplo, entre 100 e 1000 bases. Amplicons menores (comprimento de polinucleotídeo mais curto) em geral são mais confiantemente produzidos em reações PCR, permitem tempos de ciclo mais curtos, e podem ser facilmente separados e visualizados em géis de agarose ou adaptados ao uso em ensaios similares a TAQMAN® de ponto final. Amplicons menores podem ser produzidos e detectados por métodos conhecidos na técnica de detecção de DNA de amplicon. Além disso, amplicons produzidos usando os pares de iniciadores podem ser clonados em vetores, propagados, isolados e sequenciados ou podem ser sequenciados diretamente com métodos bem estabelecidos na técnica. Qualquer par de iniciadores derivado da combinação da SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 5 ou a combinação da SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 5 que são úteis em um método de amplificação de DNA para produzir um diagnóstico de amplicon de MON 87708 ou a progênie do mesmo é um aspecto da invenção. Qualquer molécula de iniciador de polinucleotídeo de DNA isolada única compreendendo pelo menos 11 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 3, ou seu complemento que é útil em um método de amplificação de DNA para produzir um diagnóstico de amplicon de MON 87708 ou progênie do mesmo é um aspecto da invenção. Qualquer molécula de iniciador de polinucleotídeo de DNA isolada única compreendendo pelo menos 11 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 4, ou seu complemento que é útil em um método de amplificação de DNA para produzir um diagnóstico de amplicon de MON 87708 ou progênie do mesmo é um aspecto da invenção. Qualquer molécula de iniciador de polinucleotídeo de DNA isolada única compreendendo pelo menos 11 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 5, ou seu complemento que é útil em um método de amplificação de DNA para produzir um diagnóstico de amplicon de

MON 87708 ou progênie do mesmo é um aspecto da invenção.

[0089] Um exemplo das condições de amplificação desta análise é ilustrado no Exemplo 3. Entretanto, qualquer modificação destes métodos ou uso de iniciadores de DNA homólogos ou complementares à SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4 ou sequências de DNA dos elementos genéticos contidos no inserto de transgene (SEQ ID NO: 5) de MON 87708 que produzem um diagnóstico de amplicon de MON 87708 está dentro da técnica. Um diagnóstico de amplicon compreende uma molécula de DNA homólogo ou complementar a pelo menos um DNA de ligação de transgene / DNA de ligação genômica (SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 8), ou uma porção substancial dos mesmos.

[0090] Uma análise da amostra de tecido vegetal do evento MON 87708 deve incluir um controle de tecido positivo do evento MON 87708, um controle negativo de uma planta de soja que não é evento MON 87708 (por exemplo, mas não limitada a A3525), e um controle negativo que não contém nenhum DNA genômico de soja. Um par de iniciadores que amplificará uma molécula de DNA de soja endógeno servirá como um controle interno das condições de amplificação de DNA. Sequências de iniciadores adicionais podem ser selecionadas a partir da SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, ou SEQ ID NO: 5 pelos versados na técnica de métodos de amplificação de DNA, e as condições selecionadas para a produção de um amplicon pelos métodos mostrados no Exemplo 3 podem diferenciar-se, mas resultar em um diagnóstico de amplicon do evento MON 87708 DNA. O uso destas sequências de iniciadores de DNA com modificações aos métodos do Exemplo 3 está dentro do escopo da invenção. O amplicon produzido pelo menos por uma sequência de iniciador de DNA derivada da SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, ou SEQ ID NO: 5 que é diagnóstico para MON 87708 é um aspecto da invenção.

[0091] Os kits de detecção de DNA contêm pelo menos um iniciador de DNA de comprimento suficiente de nucleotídeos contíguos derivados da SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, ou SEQ ID NO: 5, que quando usados em um método de amplificação de DNA produz um diagnóstico de amplicon de MON 87708 ou sua progênie é um aspecto da invenção. Uma planta MON 87708 de soja, parte vegetal, célula vegetal, semente, ou produto que produzirá um diagnóstico de amplicon de MON 87708 quando testados em um método de amplificação de DNA é um aspecto da invenção. O ensaio do amplicon de MON 87708 pode ser realizado usando um Sistema Applied Biosystems GeneAmp® PCR 9700 (executado em velocidade máxima) ou ciclador térmico MJ Research DNA Engine PTC-225 ou qualquer outro sistema de amplificação que possa ser usado para produzir um diagnóstico de amplicon de MON 87708 como mostrado no Exemplo 3.

[0092] Um depósito de uma amostra representativa da semente do evento de soja MON 87708 descrita acima e citada nas reivindicações foi feito de acordo com o Tratado de Budapeste com o American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA. 20110. O número de acesso ATCC deste depósito é PTA-9670. O depósito será mantido no depósito durante um período de 30 anos, ou 5 anos após pedido último, ou para a vida útil da patente, tudo o que for mais longo, e será substituído de acordo com a necessidade durante aquele período.

[0093] Tendo ilustrado e descrito os princípios da invenção, deve ser evidente para os versados na técnica de que a invenção pode ser modificada em arranjo e detalhe sem se afastar de tais princípios. Reivindicamos todas as modificações que estão dentro do espírito e do escopo das reivindicações acrescentadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de DNA recombinante, caracterizada pelo fato de que consiste em uma molécula de nucleotídeo consistindo em uma sequência nucleotídica selecionada a partir do grupo consistindo em SEQ ID NOs: 1 a 4 e 6 a 8, e complementos completos da mesma.

2. Molécula de DNA recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é derivada do evento de soja transgênica MON 87708, uma amostra representativa do qual depositada como ATCC PTA-9670.

3. Molécula de DNA recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida molécula de DNA é derivada do evento de soja MON 87708, uma amostra representativa do qual depositada como ATCC PTA-9670.

4. Molécula de DNA recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida molécula de DNA é um amplicon diagnóstico da presença de DNA derivado do evento MON 87708.

5. Molécula de DNA, caracterizada pelo fato de que é uma sonda compreendendo a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15 ou complementos das mesmas.

6. Par de moléculas de DNA, caracterizado pelo fato de que consiste em uma primeira molécula de DNA compreendendo a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 9 e uma segunda molécula de DNA compreendendo a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 10.

7. Método de detecção da presença de uma molécula de DNA derivada do evento de soja MON 87708 em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende:

- a. contato de uma amostra com a sonda de DNA como definida na reivindicação 5;
- b. submissão da referida amostra e da referida sonda de

DNA a condições de hibridização estringentes; e

c. detecção da hibridização da referida sonda de DNA com uma molécula de DNA na referida amostra, em que a hibridização da referida sonda de DNA à referida molécula de DNA indica a presença de uma molécula de DNA derivada do evento de soja MON 87708 na referida amostra,

uma amostra representativa de sementes de soja compreendendo o evento de soja MON 87708 tendo sido depositada como ATCC PTA-9670.

8. Método de detecção da presença de uma molécula de DNA derivada do evento de soja MON 87708 em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. contato de uma amostra com o par de moléculas de DNA como definido na reivindicação 6;

b. execução de uma reação de amplificação suficiente para produzir amplicon de DNA compreendendo uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 1 a 4 e 6 a 8, e complementos completos da mesma; e

c. detecção da presença do referido amplicon de DNA na referida reação, em que a presença do referido amplicon de DNA na referida reação indica a presença de uma molécula de DNA derivada do evento de soja MON 87708 na referida amostra,

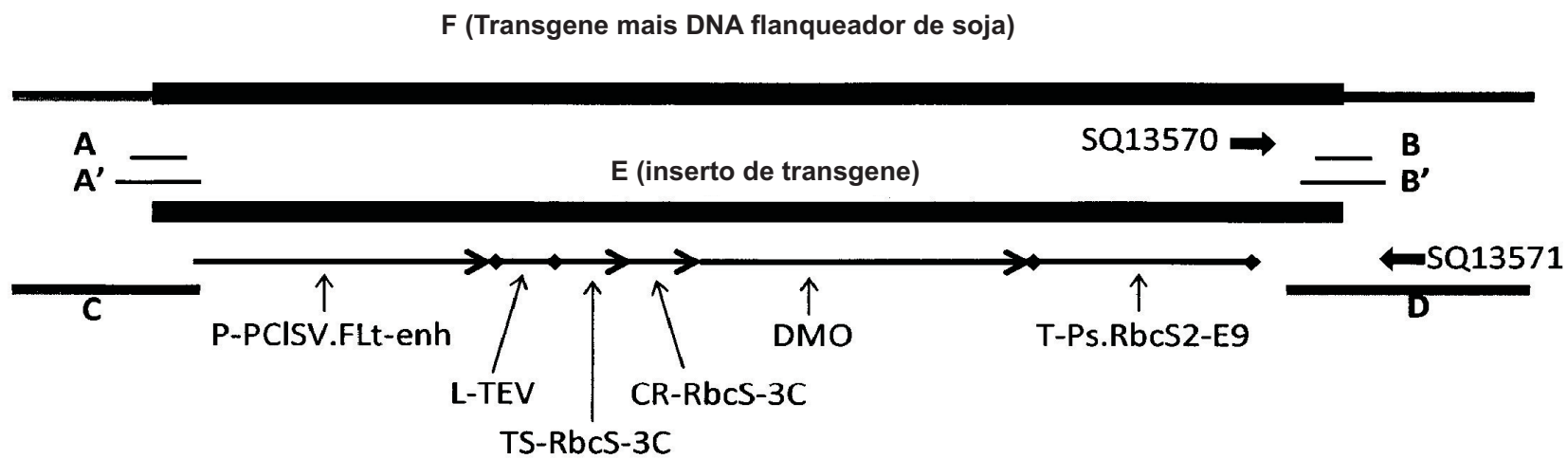
uma amostra representativa de sementes de soja compreendendo o evento de soja MON 87708 tendo sido depositada como ATCC PTA-9670.

9. Kit de detecção de DNA, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. a sonda como definida na reivindicação 5; ou

b. o par de moléculas de DNA como definido na reivindicação

7.



1/1

FIG. 1